

Veren metabolinen profiili kahta eri
ruokavaliota syöneillä atooppisilla
staffordshirenbullderiereillä

Marianna Roine
Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma
Pieneläinsairaudet
Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Helsingin yliopisto
2015



Tiedekunta - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare - Author Marianna Roine			
Työn nimi - Arbetets titel - Title Veren metabolinen profiili kahta eri ruokavaliota syöneillä atooppisilla staffordshirenbulterriereillä			
Oppiaine - Läroämne – Subject Pieneläinsairaudet			
Työn laji - Arbetets art – Level Lisensiaatin tutkielma		Aika - Datum - Month and year 15.4.2015	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 52
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p>Metabolomiikka on suhteellisen uusi tieteenala, joka tutkii aineenvaihduntatuotteiden eli metaboliittien läsnäoloa ja toimintaa erilaisissa biologisissa näytteissä, kuten veressä, virtsassa tai kudoksissa. Tiedetään, että ruokavalio on yksi merkittävimmistä ulkoisista tekijöistä, joka vaikuttaa yksilön aineenvaihduntaan, jolloin metabolomiikka soveltuukin erinomaisesti juuri ravitsemustutkimuksiin. Ihmisillä ja eläimillä on aikaisemmin tutkittu erilaisten ruokavalioiden vaikutusta isännän aineenvaihduntaan, terveyteen ja hyvinvointiin, mutta koirilla ei ole metabolomiikan avulla aiemmin tehty varsinaista raakaruokaa ja kuivaruokaa vertailevaa tutkimusta.</p> <p>Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia kahden eri ruokavalion vaikutusta koirien aineenvaihduntaan ja sen lopputuotteisiin atooppisilla koirilla. Koska aiheesta ei ollut aikaisempaa tutkimustietoa, ei varsinaisia hypoteeseja voitu tehdä. Lisäksi tutkimuksessa käytettiin kohdistamatonta eli hypoteesivapaata metabolomiikan tutkimusta, jolloin näytteistä määritettiin kaikki metaboliitit, jotka pystyttiin. Ihmisillä ja eläimillä aikaisemmin tehtyjen tutkimusten perusteella voitiin kuitenkin tehdä joitain oletuksia esimerkiksi lihapitoisen ruokavalion vaikutuksista tiettyihin metaboliitteihin, mutta aikaisempia tuloksia sovellettaessa tuli kuitenkin ottaa huomioon, että tutkimuksissa oli usein käytetty eri eläinlajeja tai ihmistä, eri näytetyyppejä tai eri tutkimusasetelmaa.</p> <p>Tutkimuksessa käytettiin kahdeksaa suomalaista staffordshirenbulterrieriä, joilla oli kaikilla eläinlääkärin toimesta todettu atooppinen ihottuma. Koirat jaettiin tutkimusta varten kahteen ryhmään, joista toinen ryhmä söi koko ruokintakokeen ajan samaa kuivaruokaa ja toinen samaa kaupallista raakaruokaa. Koirat pysyivät kyseisellä ruokavaliolla 4-5 kuukautta. Veren metaboliitit määritettiin seeruminäytteistä ennen ja jälkeen ruokintakokeen. Määrittämiseen käytettiin massaspektrometria-pohjaista menetelmää ja tulosten analysointiin pääkomponenttianalyysia sekä osittaisen pienimmän neliösumman erotteluanalyysia.</p> <p>Ennen ruokintakokeita määritetyt seerumin metaboliittitasot olivat ryhmien välillä hyvin tasaiset. Ruokintakokeen jälkeen tuloksissa puolestaan todettiin selkeät erot ryhmien välillä, jolloin yhteensä 19 metaboliitissa havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero. Tuloksissa havaittiin muutoksia muun muassa useissa metioniinin metaboliaan osallistuvissa metaboliiteissa sekä B6-vitamiinin lopputuotteessa, jotka viittaavat todennäköisesti B6-vitamiinin häiriintyneeseen metaboliaan. Se, onko tämän häiriön taustasyynä ruokavaliosta vai esimerkiksi koirien atopiasta, jäi toistaiseksi epäselväksi. Oman tutkimuksemme osalta on vielä myöhemmin tulossa aiheeseen liittyviä lisätuloksia, jotka saattavat selventää asiaa. Lisätutkimuksia vaaditaan myös muun muassa määrittämään, johtuvatko raaka- ja kuivaruoan väliset erot veren metaboliittitasoissa niiden ravintokoostumuksen eroista vai esimerkiksi erilaisista valmistustavoista. Muuttuneissa metaboliittitasoissa oli myös joitain yhtäläisyyksiä ihmisillä määritettyjen atooppiseen ihottumaan liittyvien metaboliittien kanssa, mutta tarkempien johtopäätösten tekemiseksi vaaditaan atooppisen ihottuman suhteen vielä lisätutkimuksia muun muassa terveiden ja sairaiden koirien välisten metaboliittitasojen vertailussa mahdollisten atooppiseen ihottumaan koirilla linkittyvien metaboliittien löytämiseksi.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords metabolomiikka, koira, ruokavalio, kuivaruoka, raakaruoka, atooppinen ihottuma			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited Viikin kampuskirjasto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktor och ledare - Director and Supervisor(s) Johtaja: Anna Hielm-Björkman, ohjaaja: Johanna Roine			

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	3
2.1 Metabolomiikka	3
2.1.1 Metabolomiikan tutkimus	4
2.1.1.1 Määrittämenetelmät	6
2.1.1.2 Tulosten analysointi	8
2.1.1.3 Tulevaisuuden haasteita	9
2.1.2 Metabolomiikan sovelluksia	10
2.1.3 Ravitsemuksellinen metabolomiikka	13
2.2 Koiran ruokinta	15
2.2.1 Kuivaruoka	15
2.2.2 Raakaruoka	16
2.2.3 Kuiva- ja raakaruokien merkittävimmät erot	18
2.3 Koiran atooppinen ihottuma	19
2.3.1 Patogeneesi	20
2.3.2 Oireet	21
2.3.3 Diagnostiikka ja hoito	21
2.4 Lisätutkimuksen tarve	22
3 AINEISTO JA MENELMÄT	24
3.1 Koirat	24
3.2 Käynnit	26
3.3 Näytteet	29
3.4 Analyysimenetelmät ja tilastolliset menetelmät	29
4 TULOKSET	30
4.1 Lähtötilanne	30
4.2 Tulokset ruokintakokeen jälkeen	31
5 POHDINTA	32
6 LÄHTEET	40

1 JOHDANTO

Metabolomiikka on melko uusi tieteenala, joka tutkii pienimolekyylisten aineenvaihduntatuotteiden eli metaboliittien läsnäoloa, toimintaa, rakennetta ja yhteisvaikutuksia erilaisissa biologisissa näytteissä (katsauksessa Orešič ym. 2007, katsauksessa Brennan 2013). Erityisesti muutaman viimeisen kymmenen vuoden aikana sen suosio eri tieteenalojen tutkimuksissa on kasvanut merkittävästi (katsauksessa Brennan 2013).

Ruokavalion tiedetään olevan yksi merkittävimmistä ulkoisista tekijöistä, joka vaikuttaa yksilön aineenvaihduntaan ja metaboliitteihin (katsauksessa Fave ym. 2009).

Ravitsemustutkimuksissa aikaisemmin käytetyt tutkimusmenetelmät ovat keskittyneet pitkälti määrittämään elämälle välttämättömien ravintoaineiden, kuten proteiinien, rasvojen, hiilihydraattien sekä vitamiinien pitoisuuksia ja eroavaisuuksia, mutta nykyään metabolomiikan avulla pystytään määrittämään satoja pieniä aineenvaihduntatuotteita, jotka eivät ole elämälle välttämättömiä, mutta vaikuttavat silti terveyteen ja hyvinvointiin (katsauksessa LeMieux ym. 2013). Lisäksi useilla eri taudeilla, kuten sydän- ja verisuonitaudeilla, diabeteksella ja erilaisilla syöville, on todettu olevan selvä yhteys ravintoon (Giovannucci ym. 2007, Nettleton ym. 2008, Liu ym. 2009, Julia ym. 2010). Metabolomiikka onkin osoittautunut hyödylliseksi työkaluksi ravitsemustutkimuksissa ja viime aikoina sen avulla on tutkittu erityisesti ruokavalion vaikutusta yleiseen terveyteen ja hyvinvointiin sekä sairauksien ehkäisyyn ja hoitoon (O'Sullivan ym. 2011, katsauksessa O'Gorman & Brennan 2015). Koirilla ei ole aikaisemmin vertailtu raaka- ja kuivaruuan vaikutusta niiden metaboliittitasoihin. Atooppista ihottumaakin on ihmisillä tutkittu metabolomiikan avulla vasta hyvin vähän (Assfalg ym. 2012, Huang ym. 2014) ja koirilla ei lainkaan.

Kirjallisuuskatsauksessa kuvataan metabolomiikkaa tieteenalana, sen määritysmenetelmiä ja tämän päivän eri sovellusaloja. Lisäksi perehdytään lyhyesti koiran atooppisen ihottumaan sekä kuiva- ja raakaruuan eroihin. Koska aihetta ei ole suoranaisesti tutkittu aikaisemmin, on kirjallisuuskatsauksessa otettu kantaa joihinkin omaa tutkimustamme mahdollisimman läheisesti koskettaviin tutkimuksiin. Näissä on kuitenkin käytetty vaihtelevasti eri eläinlajeja tai ihmistä, eri näytetyyppejä tai erilaista tutkimusasetelmaa, mikä täytyi ottaa huomioon aikaisempia tuloksia sovellettaessa.

Oma tutkielmani on osa isompaa staffordshirenbulldogterriereillä suoritettavaa ruokintatutkimusta. Oman tutkielmani aihe rajattiin kuitenkin metabolomiikan osuuteen, jossa tutkittiin kahden eri ruokavalion, kuivaruoan ja raakaruoan, vaikutusta koirien seerumin metaboliittitasoihin. Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia ruokavalion vaikutusta koiran aineenvaihduntaan ja sen lopputuotteisiin atooppisilla koirilla. Koska aihetta ei ollut aiemmin tutkittu, haluttiin tutkimuksen avulla kartoittaa eri ruokintavaihtoehtojen vaikutusta koirien terveyteen ja hyvinvointiin sekä sairauksien, tässä tapauksessa atooppisen ihottuman mahdolliseen ehkäisyyn ja hoitoon. Samassa ruokintatutkimuksessa vertailtiin myös atooppisten ja terveiden koirien välisiä eroja niiden seerumin metaboliittitasoissa, mutta kyseisen tutkimuksen tulokset valmistuvat vasta myöhemmin.

Tutkimuksessa määritettiin kaikki 102 metaboliittia, jotka tulosten analysointiin käytetyllä laboratoriolla oli tarjota, jolloin kyseessä oli kohdistamaton eli hypoteesivapaa metabolomiikan tutkimus. Tutkimuskoirille syötetyt ruokavaliot erosivat kuitenkin ravintoainekoostumukseltaan ja raaka-aineiltaan selkeimmin muun muassa hiilihydraatti-, rasva ja lihapitoisuuksiensa puolesta, jolloin aikaisemmin tehtyjen tutkimusten perusteella voitiin lähtökohtaisesti tehdä joitain ennakko-oletuksia mahdollisista eroista metaboliittitasoissa. Aikaisemmissa tutkimuksissa oli todettu esimerkiksi lihapitoisemman ruokavalion vaikuttavan tiettyihin metaboliitteihin, kuten kreatiiniin, kreatiniiniin ja trimetyyliamiini-typpioksideihin eli TMAO:in (Stella ym. 2006, Xu ym. 2010, Rasmussen ym. 2012). Hiilihydraatti- ja rasvapitoisten ruokavalioiden vaikutusta elimistön metaboliittitasoihin oli puolestaan tutkittu huomattavasti proteiinipitoisen ruokavalion vaikutuksia vähemmän. Näiden tutkimusten tulokset olivat lisäksi vaihtelevampia tai niiden tutkimusasetelmat erosivat merkittävästi omastamme, jolloin ravinnon korkean rasva- tai hiilihydraattipitoisuuden vaikutuksista ei voitu tehdä samanlaisia ennakko-oletuksia (Vester ym. 2009, Bertram ym. 2012, Pieper ym. 2012).

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Metabolomiikka

Jo Keskiajalta asti ihmiset ovat todenneet erilaisten lääketieteellisten tilojen vaikuttavan muutoksiin kehon nesteissä ja kudoksissa, kuten esimerkiksi virtsan hajuun, makuun ja väriin (katsauksessa Nicholson & Lindon 2008). Kiinalaiset käyttivätkin aikoinaan muun muassa muurahaisia osoittamaan virtsan kohonneet sokeripitoisuudet diabetespotilailla (katsauksessa Orešič ym. 2007). Metabolomiikka varsinaisena tieteenalana kehittyi kuitenkin vasta 1960-luvun loppupuoliskolla ja on erityisesti viime vuosina saavuttanut suuren mielenkiinnon eri tutkimusalojen parissa (Dalglish ym. 1966, katsauksessa Brennan 2013).

Metabolomiikka on tieteenala, joka tutkii pienimolekyylisten aineenvaihduntatuotteiden eli metaboliittien läsnäoloa, toimintaa, rakennetta ja yhteisvaikutuksia erilaisissa biologisissa näytteissä (katsauksessa Orešič ym. 2007, katsauksessa Brennan 2013).

Tällaisia biologisia näytteitä ovat muun muassa plasma, seerumi, virtsa, sylki, aivoselkäydinneste, nivelneste, sperma ja erilaiset kudoksenäytteet (Goodson ym. 2012, Locasale ym. 2012, Tian ym. 2013, Tsuruoka ym. 2013, Calvani ym. 2014, Hermo ym. 2014, Overmyer ym. 2015). Metabolomiikan avulla pystytään määrittämään näytteen koko metabolomi eli kaikki siinä olevat aineenvaihduntatuotteet, jolloin saadaan kattava kuva näytteen solujen metabolisesta aktiivisuudesta (Tweeddale ym. 1998).

Metabolomin koostumukseen vaikuttavat sekä geneettiset että ympäristöperäiset tekijät, kuten elämäntapa, saasteet, lääkkeet, suoliston pieneliökanta ja ennen kaikkea ruokavalio, jolloin metabolomiikan avulla pystytäänkin tutkimaan aineenvaihduntareittien vaihtelevuutta tällaisissa erilaisissa elimistön ja kudosten muutostiloissa (Wagner ym. 2001, Mellert ym. 2011, Chorell ym. 2012, Cappello ym. 2013, Marcobal ym. 2013, Hermo ym. 2014, Yu ym. 2014). Merkittäviä muutoksia pystytään näkemään jo vähäisten stimulusten jälkeen, jolloin metabolomiikan avulla voidaan saada tietoa jo varhaisista biologisista muutoksista isännän elimistössä (Noto, ym. 2013, Trushina ym. 2013, Gao ym. 2014). Metabolomiikan avulla onkin pystytty osoittamaan useita sairauksien tai ympäristöperäisten tekijöiden seurauksena aiheutuneita biologisia muutoksia ja paljastamaan yleisiä mekanismeja, joita ei aiemmin muilla tutkimusmenetelmillä ole pystytty määrittämään (katsauksessa Johnson & Gonzalez 2012).

Nisäkäs- ja kasvisoluissa on arvioitu olevan noin 3000 – 8000 metaboliittia (Kind ym. 2009). Metaboliitit käsittävät laajan ryhmän molekyylipainoltaan pieniä rakenteita, kuten lipidejä, aminohappoja, peptidejä, nukleiinihappoja, orgaanisia happoja, vitamiineja, tiroleja ja hiilihydraatteja (katsauksessa Zhang ym. 2012a). Ne ovat solun säätelyprosessien lopputuotteita, joiden tasoja voidaan pitää biologisen systeemin lopullisena vasteena geneettisille ja ympäristöperäisille muutoksille (katsauksessa Fiehn 2002). Toisin kuin esimerkiksi geenien lähetti-RNA-pitoisuudet, metaboliitit ovat fysiologisia viestinviejiä ja reagoivat näin ollen suoraan elimistön fysiologisiin ja patologistiin vasteisiin (katsauksessa Orešič ym. 2007). Osa nisäkkäiden ja kasvien metaboliiteista on eksogeenisiä eli ulkosyntyisiä, kuten suoliston pieneliöstöstä, ilman saasteista, hyönteismyrkyistä tai lääkkeistä peräisin olevia (katsauksessa Zhang ym. 2011). Sisäsyntyisiä eli endogeenisiä metaboliitteja puolestaan ovat ne, joita isäntä tuottaa oman aineenvaihduntansa seurauksena (katsauksessa Serkova ym. 2011). Eri näytetyyppien metaboliittipitoisuudet voivat vaihdella jopa tuhatkertaisesti ja saattavat olla kemialliselta koostumukseltaan hyvinkin erilaisia (katsauksessa Orešič ym. 2007).

Metabolomiikkaa on käytetty menestyksekkäästi useilla eri tieteenaloilla, kuten fysiologiassa, diagnostiikassa, toiminnallisessa genomiikassa, farmakologiassa, toksikologiassa ja ravitsemustieteissä (Mellert ym. 2011, Cappello ym. 2013, Noto ym. 2013, Yu ym. 2014, Overmyer ym. 2015). Nykyään metabolomiikka on silti edelleen vielä lastenkengissä, sillä useita siihen liittyviä rajoitteita ei ole pystytty ratkaisemaan eikä se ole sen takia pysynyt esimerkiksi genetiikan tekniikoiden perässä (katsauksessa Griffiths ym. 2010).

2.1.1 Metabolomiikan tutkimus

Metabolomiikan tutkimusta suunniteltaessa tulee ottaa huomioon metabolomin herkkyys useille ulkoisille ja sisäisille tekijöille, jotta pystytään minimoimaan häiriötekijät ja näin optimoimaan saatu informaatio (katsauksessa Johnson & Gonzalez 2012). Tutkimuksissa tulee käyttää riittävän laajaa otoskokoa, jotta yksilöiden välinen vaihtelu vaikuttaisi mahdollisimman vähän (katsauksessa Johnson & Gonzalez 2012). Lisäksi potilaiden valinnassa tulisi ottaa käyttöön tiukat kriteerit, koskien muun muassa ikää, ruumiinkuntoa ja terveydentilaa (katsauksessa Johnson & Gonzalez 2012). Ennen metabolomiikan analyysia tulee tarkoin miettiä käytettävät menetelmät kudosten uuttamista, näytteiden preparointia sekä datan hankintaa ja käsittelemistä varten

(katsauksessa Fiehn 2002). Tutkimusmenetelmän valintaan vaikuttavat muun muassa käytetty näytetyyppi sekä tutkimuksen perimmäinen tavoite (katsauksessa Johnson & Gonzalez 2012). Metabolomiikan tutkimuksia voidaan lähestyä eri näkökulmista, käyttäen joko kohdistamatonta tai kohdistettua menetelmätapaa (katsauksessa Astarita & Langridge 2013).

Kohdistamattomassa metabolomiikassa näytteistä määritetään tasapuolisesti kaikki metaboliitit, tarkoituksena vertailla niiden profiileja erilaisten ryhmien välillä (katsauksessa Astarita & Langridge 2013). Kyseisellä menetelmällä saatu aineisto on hyvin laaja, joten sen käsittelyyn vaaditaan tilastollisia työkaluja sekä monimuuttuja-analyyseja, joiden avulla pystytään lajittelemaan havaitut muutokset pienempiin ryhmiin (katsauksessa Griffiths ym. 2010). Kohdistamattoman metabolomiikan käyttö soveltuu erityisesti hypoteesivapaisiin tutkimuksiin, kuten sairauksien indikaattorimolekyylien määrittämiseen, jolloin saatu data antaa kokonaisvaltaisen kuvan metabolisista vaihteluista sairaiden ja kontrollien välillä (katsauksessa Brennan 2013). Lisäksi sitä voidaan käyttää esimerkiksi ravitsemustieteessä määrittämään ruoan molekylaarista koostumusta, luonnehtimaan yksilön metabolista ilmiä ja määrittämään ruokavalion vaikutusta aineenvaihduntaan (Andersen ym. 2014a&b).

Kohdistetussa metabolomiikassa näytteistä puolestaan tutkitaan tiettyjä, ennalta valittuja metaboliitteja, jolloin menetelmä perustuu hypoteesiin (katsauksessa Griffiths ym. 2010). Kohdistettua metabolomiikkaa voidaan käyttää esimerkiksi ravitsemustutkimuksissa määrittämään tiettyjen aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksia, hyväksikäytettävyyttä ja vaihtuvuutta sekä ravintoaineiden aineenvaihduntaa (katsauksessa Astarita & Langridge 2013).

Metabolomiikan tutkimuksen vaiheisiin kuuluvat tyypillisesti näytteiden hankkiminen ja esikäsittely, metaboliittien eristäminen ja datan kerääminen sekä datan käsittelemiseen tarkoitettujen tilastollisten monimuuttuja-analyysien suorittaminen (katsauksessa Orešič ym. 2007, katsauksessa Brennan 2013). Lisäksi yksittäisten tutkimusten tulokset tulisi aina vahvistaa tulosten luotettavuuden takaamiseksi ja jatkokäytön mahdollistamiseksi (katsauksessa Serkova ym. 2011).

2.1.1.1 Määrittämenetelmät

Yleisimmin käytetyt metabolomiikan määrittämenetelmät ovat magneettispektroskopia eli NMR (nuclear magnetic resonance) ja massaspektrometria eli MS (mass spectrometry) (katsauksessa Zhang ym. 2012a).

Magneettispektroskopiassa molekyylit altistetaan magneettikentälle, jolloin menetelmä kykenee erottelamaan erilaiset ytimet niiden resonointitaajuuden perusteella (katsauksessa Serkova ym. 2011). Menetelmän etuina ovat muun muassa yksinkertainen näytteiden esikäsittely, korkea toistettavuus, vakiintuneet tiedon käsittelymenetelmät sekä vähäinen laboratorioden välinen vaihtelevuus (katsauksessa Johnson & Gonzalez 2012, katsauksessa Brennan 2013). Magneettispektroskopiaa käytettäessä tutkittava neste ei vaadi fysikaalista tai kemikaalista käsittelyä ennen tutkimista, jolloin menetelmä ei myöskään tuhoa näytettä, vaan sitä pystytään tarvittaessa käyttämään vielä muihin jatkotutkimuksiin (katsauksessa Nicholson & Lindon 2008, katsauksessa LeMieux ym. 2013).

Magneettispektroskopian haittoja ovat muun muassa kohtuullisen suuren näytekoon vaatiminen ja heikompi sensitiivisyys (katsauksessa Brennan 2013). Uusien tekniikoiden kehittymisen myötä magneettispektroskopiaan pohjautuvien menetelmien herkkyyttä on saatu parannettua (Keun ym. 2002), mutta menetelmä on edelleen melko epäherkkä hyvin pienille metaboliittipitoisuuksille, mikä muodostaa suurimman rajoitteen sen käytössä (katsauksessa Serkova ym. 2011).

Massaspektrometria vaatii yleensä ensin metaboliittien erottelun näytteestä ennen analysointia (katsauksessa Nicholson & Lindon 2008). Erottelun jälkeen metaboliitit ionisoidaan ja lajitellaan massa-analysointorilla, minkä jälkeen detektori tunnistaa ja määrittää metaboliitit (katsauksessa LeMieux ym. 2013).

Massaspektrometriaa käytettäessä näytteen esikäsittely ennen analyysia on erittäin tärkeässä roolissa metabolomin monimutkaisuuden ja suuren vaihteluvälin vuoksi (katsauksessa Griffiths ym. 2010). Osa tutkijoista on sitä mieltä, että näytteen käsittely tulisi pitää minimissään, sillä uskotaan, että näytteen käsittely voi aiheuttaa hallitsematonta analyttien häviämistä tai valikoitumista, mikä puolestaan voi olla haitallista analyysin kannalta (katsauksessa Griffiths ym. 2010). Näytteen käsittelymenetelmät riippuvat käytetystä näytetyypistä, analyttisestä menetelmästä ja

siitä, onko analyysin tavoitteena tiettyjen metaboliittien vai koko metabolomin tunnistaminen (katsauksessa Griffiths ym. 2010).

Metaboliittien erotteluun yleisimmin käytettyjä menetelmiä ovat muun muassa kaasukromatografia-MS eli GC-MS (gas chromatography-MS), nestekromatografia-MS eli LC-MS (liquid chromatography-MS) ja korkean erotuskyvyn nestekromatografia-MS eli UHPLC-MS (ultra-high performance liquid chromatography-MS) (katsauksessa Johnson C & Gonzalez 2012). GC-MS-menetelmien etuina ovat muun muassa kattavat tietokannat metaboliittien tunnistusta varten, suurempi herkkyys erityisesti vapaille rasvahapoille sekä ionien tuhoamattomuus (katsauksessa Johnson & Gonzalez 2012). Menetelmän haittoja puolestaan ovat laaja näytteen esikäsittely ja sen mahdolliset vaikutukset tulosten vaihtelevuuteen (katsauksessa Johnson & Gonzalez 2012). Lisäksi GC-MS-menetelmällä voidaan tutkia ainoastaan haihtuvia yhdisteitä tai yhdisteitä, jotka pystytään derivoimaan eli muuttamaan haihtuviksi (katsauksessa Griffiths ym. 2010). Derivointi on aikaa vievää, kallista ja saattaa johtaa metaboliittien katoamiseen (katsauksessa Serkova ym. 2011). LC-MS-menetelmä soveltuu puolestaan parhaiten rasvaliukoisille yhdisteille eikä se vaadi derivointia (katsauksessa Serkova ym. 2011, katsauksessa Brennan 2013). UHPLC-MS-menetelmän etuina taas on lyhyt erottelu-aika, korkea erottelukyky, korkea massatarkkuus, yksinkertainen näytteen esikäsittely, suuri sensitiivisyys ja laajempi metaboliittien tunnistus kuin GC-MS-menetelmillä (katsauksessa Johnson & Gonzalez 2012).

Yleisesti ottaen massaspektrometrian etuina magneettispektroskopiaan verrattuna ovat muun muassa korkeampi herkkyys ja spesifisyys, parempi metaboliittien erottelukyky sekä metabolomin parempi kattavuus (katsauksessa Griffiths ym. 2010, katsauksessa LeMieux ym. 2013). Herkkyytensä ansiosta massaspektrometrialla pystytään havaitsemaan paljon vähäisempiä pitoisuuksia sekä tutkimaan ja vertailemaan keskenään hyvinkin erikokoisia aineenvaihduntatuotteita (katsauksessa Orešič ym. 2007, katsauksessa Serkova ym. 2011). Merkittävimpiä rajoituksia ovat puolestaan raakadatan käsittelemiseen tarkoitettujen vakiintuneiden protokollien rajoitettu määrä, riippuvaisuus erilaisista metaboliittien erotteluun käytetyistä menetelmistä sekä näytteen tuhoutuminen (katsauksessa Griffiths ym. 2010). Lisäksi näytteiden käsittely ja tulosten monimutkainen analysointi tekevät menetelmästä työlää (katsauksessa Orešič ym.

2007). Näytteiden laajat käsittelyt voivat myös muuttaa metaboliittien rakennetta, mikä puolestaan voi häiritä tuloksia ja aiheuttaa suurempaa näytteiden välistä vaihtelua (katsauksessa Serkova ym. 2011). Massaspektrometrian käyttö on kuitenkin ollut suosittumpaa viimeisen kymmenen vuoden aikana kuin magneettispektroskopian (katsauksessa Griffiths ym. 2010).

2.1.1.2 Tulosten analysointi

Metabolomiikan tutkimusmenetelmiä käyttämällä saadaan yleensä hyvin runsaasti tietoa, minkä hallinnointi asettaa kovia vaatimuksia tiedonkäsittelylle (katsauksessa Gibbons ym. 2015). Tulosten analysointi onkin tärkeä osa tutkimuksia (katsauksessa Griffiths ym. 2010). Analysointia varten on kehitetty useita erilaisia monimuuttuja-analyysimenetelmiä, joiden avulla saadaan tietoa eri metaboliittitasojen välisistä suhteista ja sitä kautta koko systeemin laajuinen näkemys metabolomista pelkkien yksittäisten metaboliittimäärien muutosten sijaan (Jansen ym. 2012a). Yleisimmin käytettyjä monimuuttuja-analyyseja ovat pääkomponenttianalyysi eli PCA (principal component analysis), osittainen pienimmän neliösumman erotteluanalyysi eli PLS-DA (partial least squares discriminant analysis) ja suorakulmainen PLS-DA eli O-PLS-DA (orthogonal PLS-DA) (katsauksessa O'Gorman & Brennan 2015).

Pääkomponenttianalyysi on tekniikka, joka sallii tulosten visualisoinnin yhtäläisyyksien ja/tai eroavaisuuksien hahmottamiseksi eri luokkien välillä ilman esioletuksia (katsauksessa Brennan 2013). Pääkomponenttianalyysin avulla ei tosin voida hahmottaa metaboliittien välisiä suhteita, koska se kattaa kaikki metaboliset vaihtelut samanaikaisesti (Jansen ym. 2012a). PLS-DA ja O-PLS-DA ovat puolestaan menetelmiä, joissa käytetään hyväksi aiempaa tietoa tutkittavista näyteryhmistä (katsauksessa Bartel ym. 2013). Näitä käytetään yleensä luokitustarkoitukseen, jolloin sen avulla voidaan joko todentaa ne muuttujat, jotka eroavat ennalta määrättyjen ryhmien välillä tai ennustaa, mihin ryhmään näytteen tulisi kuulua käyttämällä ennalta tunnettua ryhmäjakoja (katsauksessa Bartel ym. 2013). Jälkimmäisten menetelmien ongelmana on erityisesti päällekkäisyyksien riski, minkä korjaamiseksi tulosten vahvistaminen on välttämätön vaihe (Westerhuis ym. 2008). Metabolomin monimutkaisuuden ja metaboliittien moninaisten ominaisuuksien takia vain yhden analyttisen menetelmän käyttö ei kuitenkaan ole usein riittävää koko metabolomin

määrittämiseksi, vaan erilaisten yhdistelmien käyttö on suositeltavaa (katsauksessa Zhang ym. 2012b).

2.1.1.3 Tulevaisuuden haasteita

Metabolisissa profiileissa on paljon yksilöiden välisiä eroavaisuuksia (katsauksessa Jansen ym. 2012b). Näiden vaihtelevuuksien merkitys yleensä pienenee tai jää kokonaan huomioimatta metabolomiikassa käytettyjen perusmenetelmien kohdalla, vaikka ne saattaisivatkin sisältää runsaasti tietoa tutkimuksiin liittyen (katsauksessa Jansen ym. 2012b). Koirilla ja kissoilla tehdyssä tutkimuksessa todettiin, että yksilöiden välillä oli merkittävää vaihtelua plasman metabolomissa (Colyer ym. 2011). Myös eri metaboliittien tai metabolia-alueiden säätely saattaa vaihdella yksilöiden välillä (Colyer ym. 2011). Koirilla mahdollisesti koko ja rotu voivat vaikuttaa yksilöiden välisiin eroihin, sillä koirien keskuudessa on paljon suuremmat erot esimerkiksi fyysisissä ja geneettisissä vaihteluissa kuin vastaavasti kissalla (Vian ym. 2007). Myös ihmisillä tehdyissä metabolomiikan ravitsemustutkimuksissa yksilön on todistettu olevan merkittävin vaihtelua aiheuttava tekijä (katsauksessa Scalbert 2009). Yksilöiden perintötekijät, sukupuoli, ikä, elämäntapa, ruokavalio, sairaudet ja suoliston pieneliöstökanta ovat todennäköisesti merkittävimmät vaihtelua aiheuttavat tekijät (Johnson ym. 2012). Onkin ehdotettu, että tulevaisuudessa nämä tekijät pitäisi ottaa paremmin huomioon metabolomiikan tutkimuksia suunniteltaessa ja toteutettaessa (katsauksessa Scalbert 2009).

Yksi metabolomiikan tutkimusmenetelmiin liittyvistä merkittävimmistä haasteista on yhden kattavan menetelmän puuttuminen, jolla saataisiin koko metabolomi määritettyä (katsauksessa Zhang ym. 2012b). Vaikka metabolomiikan analyysit ovat suhteellisen nopeita, edullisia ja tarkkoja, on biologisen systeemin koko metabolomin yhtäaikainen ja yksiselitteinen määrittäminen kuitenkin haastavaa (katsauksessa Fiehn 2002).

Analyyttisten menetelmien herkkyyksien ja spesifisyyksien sekä menetelmien rutiinikäytön kehittyminen edelleen auttavat kuitenkin tulevaisuuden tavoitteiden saavuttamisessa (katsauksessa Zhang ym. 2012b). Lisäksi tunnettujen metaboliittien määrittäminen on usein vaikeaa, sillä useimmille yhdisteille ei ole olemassa kunnollisia normeja (katsauksessa Zhang ym. 2011). Jotta metabolomiikan tutkimuksesta saataisiin nykyistä enemmän irti, tulisi kehittää entistä kattavampia ja julkisia metabolomiikan tietokantoja (katsauksessa Fiehn 2002).

2.1.2 Metabolomiikan sovelluksia

Koska elimistön aineenvaihdunnallisen tasapainon häiriintyminen on tyypillistä erilaisissa sairaustiloissa, metabolomiikka tarjoaa varteenotettavan työkalun muun muassa lääketieteessä sairauksien syntymekanismien ja kehittymisen tutkimisessa sekä diagnostiikan ja asianmukaisten hoitojen suunnittelussa (katsauksessa Serkova ym. 2011, katsauksessa Zhang ym. 2012b). Metabolomiikan avulla pystytään tunnistamaan jo varhaiset sairauden biokemialliset muutokset, mikä mahdollistaa aikaisemman diagnostiikan ja hoidon nopean aloittamisen (Noto, ym. 2013, Trushina ym. 2013). Metabolomiikkaa on käytetty viime vuosina apuna muun muassa neoplastisten, aineenvaihdunnallisten, hermostollisten, endokriinisten ja ruoansulatuskanavaan liittyvien sairauksien tutkimisessa (Huang ym. 2013, Trushina ym. 2013, Xu ym. 2013, Zhang ym. 2013, Yau ym. 2014).

Yksilötasolla metabolomiikan avulla voidaan tutkia yksilöiden herkkyyttä muun muassa sairauksien kehittymiselle, lääkeaineille tai ravintoaineille, minkä avulla pystytään puolestaan suunnittelemaan jokaiselle henkilökohtaisesti paras hoito, lääkitys tai ruokavalio (katsauksessa Nicholson & Lindon 2008). Väestötasolla metabolomiikkaa voidaan soveltaa niin sanottuun molekyläariseen epidemiologiaan, minkä avulla pystytään määrittämään tiettyjen ryhmien herkkyyksiä esimerkiksi sairauksia kohtaan ja vaikuttamaan näin yleiseen väestön terveyteen (katsauksessa Nicholson & Lindon 2008). Tutkimalla sairauksien biokemiallisia kehitysreittejä, metabolomiikkaa voidaan käyttää myös lääketeollisuuden apuna kehittämään uusia käyttökohteita lääkkeille (katsauksessa Nicholson & Lindon 2008).

Nykypäivänä suurin osa potilastyössä käytettävistä kliinisen kemian testeistä perustuu vanhaan teknologiaan eivätkä ne siksi ole sensitiivisiä eivätkä spesifisiä mitään tiettyä sairautta kohtaan (katsauksessa Zhang ym. 2012a). Ne mittaavatkin yleensä vain yhtä metaboliittia, ovat puhtaasti laadullisia ja niiden tulkintaan täytyy usein liittää muita analyttisiä tai kliinisiä tutkimusmenetelmiä (katsauksessa Serkova ym. 2011). Lisäksi niissä käytetyt perinteiset indikaattorimolekyylit kohoavat yleensä vasta merkittävässä vaurioissa (katsauksessa Zhang ym. 2012a). Tämän takia seerumin suuren sensitiivisyyden ja spesifisyyden omaavat metaboliitit ovat sairauden ensisijaisina indikaattoreina käytännöllisempiä (katsauksessa Nicholson & Lindon 2008). Metabolomiikka mittaakin useita, jopa satoja eri metaboliitteja muodostaen

monimutkaisia metabolisia profiileja näytteistä (katsauksessa Serkova ym. 2011). Muita etuja ovat muun muassa suhteellisen vähäinen näytemäärä sekä nopea vastauksen saaminen (katsauksessa Griffiths ym. 2010).

Vaikka metabolomiikan sovellukset tarjoavatkin käytännöllisen työkalun lääketieteen tutkimuksissa, sen käyttö klinikoiden keskuudessa on nykypäivänä kuitenkin vielä vähäistä (katsauksessa Orešič ym. 2007). Osasyynä tähän on muun muassa se, että metabolomiikka tieteenalana on useille praktikoille vieras (katsauksessa Collino ym. 2012). Soveltamista kliniseen käyttöön rajoittaa lisäksi se, että tutkimuksille tulisi olla heti käytettävissä oleva laboratorio ja tutkijan tulisi hallita spektrin tulkinta ja tulosten analyysin suorittaminen (katsauksessa Serkova ym. 2011). Vaaditaankin vielä lisätutkimuksia, jotta voidaan löytää seerumin metaboliittien analysoinnille ideaali menetelmä, jota voitaisiin käyttää myös kliinisessä diagnostiikassa (katsauksessa Zhang ym. 2012b).

Metabolomiikan käyttö farmakologian tutkimuksissa on myös yleistynyt viime vuosina (katsauksessa Orešič ym. 2007). Metabolomiikan avulla voidaan muun muassa tunnistaa uusia vaikutuskohteita lääkkeille sekä arvioida lääkkeiden toksisuutta ja tätä kautta kehittää tarkempia ja turvallisempia lääkkeitä (Yang ym. 2011, Duarte ym. 2013). Aikaisemmat lääkereaktiotestit ovat perustuneet lähinnä CYP-entsyymien tai muiden vastaavien lääkeaineiden metaboliaan osallistuvien entsyymien toimintaan (katsauksessa Johnson & Gonzalez 2012). Todellisuudessa lääkeaineiden metaboliaan vaikuttavat kuitenkin myös useat muut tekijät, kuten ruokavalio ja suoliston pieneliöstö, jotka pystytään ottamaan huomioon metabolomiikan avulla (katsauksessa Johnson & Gonzalez 2012). Yksilön metabolinen ilmiö on yksi merkittävistä lääkevaikutusten yksilöllisten erojen selittävistä tekijöistä ja metabolomiikka onkin oiva työkalu tutkittaessa yksilöiden vasteita lääkehoitoon (katsauksessa Orešič ym. 2007). Metabolomiikan avulla pyritään muun muassa arvioimaan yksilön kykyä metaboloida lääkeaineita ja sitä kautta ennustaa yksilön herkkyyttä mahdollisille sivuvaikutuksille (katsauksessa Nicholson & Lindon 2008). Indikaattorimolekyylejä määrittämällä pystyttäisiin mahdollisesti tunnistamaan ne herkät yksilöt, joille lääkeaineen annosta tulisi laskea tai lopettaa käyttö kokonaan jo varhaisessa vaiheessa mahdollisten myöhempien haittavaikutusten ehkäisemiseksi (katsauksessa Orešič ym. 2007). Tällä tiedolla olisi suuri vaikutus yksilöllistettyyn terveydenhuoltoon sekä hoitojen entistä

parempaan kohdistamiseen (katsauksessa Nicholson & Lindon 2008). Sairauksien ehkäisyyn ja tehokkaampien hoitomenetelmien seurauksena metabolomiikan tutkimuksilla voi olla vaikutusta myös koko kansanterveyteen (katsauksessa Zhang ym. 2012). Metabolomiikan avulla voidaankin mahdollisesti säästää sekä aikaa että rahaa lääkkeiden kehittämisessä (katsauksessa Griffiths ym. 2010).

Metabolomiikan lääketieteellisissä sovelluksissa seerumi on yleisimmin käytetty biologinen neste, sillä sen saaminen on suhteellisen helppoa ja se sisältää runsaasti tietoa kehon biokemiallisista tiloista, mikä tekee siitä hyvän erityisesti sairauksien varhaisessa diagnosoinnissa (katsauksessa Zhang ym. 2012b). Sillä on myös useita etuja verrattuna muihin näytetyyppeihin ja se on kustannuksiltaan edullista (katsauksessa Zhang ym. 2012b). Sitä on helppo kerätä suhteellisen suuriakin määriä eikä se vaadi tarkkoja käsittely- tai säilöntämenetelmiä (katsauksessa Serkova ym. 2011). Seerumin metabolista profiilia voidaan pitää mittarina koko kehon fysiologisista ja patologisista tiloista, sillä veri on kontaktissa kaikkien kudosten kanssa (katsauksessa Serkova ym. 2011, katsauksessa Zhang ym. 2012b). Se on hyvin homeostaattinen biologinen neste eivätkä siihen vaikuta yhtä paljon erilaiset häiriötekijät, kuten ikä, sukupuoli, ruokavalio, nestetasapaino ja stressi (katsauksessa Serkova ym. 2011). Proteiinit ja muut makromolekyylit, jotka saattavat häiritä tuloksia, saadaan helposti poistettua käyttämällä asiallisia uuttamismenetelmiä (katsauksessa Serkova ym. 2011). Seerumin metabolista analyysia voidaankin pitää käytännöllisenä diagnostisena menetelmänä ja sen avulla voidaan seurata sekä sairauden kehittymistä että terapeutin hoidon tehoamista (katsauksessa Zhang ym. 2012b). Seeruminäytteet tulee tutkia joko välittömästi tai pakastaa -80°C:ssa heti näytteenoton jälkeen (katsauksessa Zhang ym. 2012b).

Seerumin yksityiskohtaisen analysoinnin tekniikoiden kehittyminen ja soveltaminen on johtanut useiden eri sairauksiin linkittyvien indikaattorimolekyylien tunnistamiseen (katsauksessa Zhang ym. 2012b). Tarvitaan vielä lisätutkimuksia, jotta saadaan määritettyä kattavasti veren normaali fysiologinen metabolomi ja sitä kautta useiden endogeenisten yhdisteiden normaalit vaihteluvälit (katsauksessa Serkova ym. 2011). Analyyttisten normien sekä plasman ja seerumin metaboliittien viitearvojen puuttuminen vaikeuttaa toistaiseksi tulosten arviointia (katsauksessa Serkova ym. 2011).

2.1.3 Ravitsemuksellinen metabolomiikka

Ravintoaineet vaikuttavat aineenvaihduntaan useiden eri säätelymekanismien kautta johtaen paikallisiin ja yleistyneisiin muutoksiin metaboliittitasoissa (katsauksessa LeMieux ym. 2013). Näitä muutoksia on aikaisemmin keskitytty tutkimaan ennen kaikkea geeni- ja proteiinitasolla, mutta viime aikoina metabolomiikan avulla on päästy perehtymään koko metabolomiin ja sen toimintaan (katsauksessa LeMieux ym. 2013). Metabolomiikka onkin erinomainen työkalu tutkittaessa ruokavalion vaikutusta aineenvaihduntaan (katsauksessa Griffiths ym. 2010). Metabolomiikkaa käytetään ravitsemustutkimuksessa yhdessä genomiikan ja proteomiikan rinnalla, tarkoituksena pyrkiä määrittämään tietyille ravintoaineille ominaisia indikaattorimolekyylejä, tutkimaan ravintoon linkittyviä sairauksia sekä tutkimaan ruokavalion vaikutusta yleiseen terveyteen ja hyvinvointiin (katsauksessa LeMieux ym. 2013, katsauksessa O'Gorman & Brennan 2015).

Tiedetään hyvin, että ruokavalio on yksi merkittävä ulkoinen tekijä, joka vaikuttaa yksilön terveyteen ja hyvinvointiin (katsauksessa Fave ym. 2009). Ymmärryksemme ravinnon vaikutuksesta terveyteen on kuitenkin toistaiseksi vielä rajoittunutta, mikä on osaltaan seurausta ruoan molekyylikoostumuksen vähäisestä tuntemuksesta (katsauksessa Astarita & Langridge 2013). Viime aikoina metabolomiikan käyttö ravitsemustutkimuksissa on kuitenkin yleistynyt nopeasti, mikä on johtanut jo useiden eri ruokien tai ravintoaineiden tarkemman kemiallisen koostumuksen määrittämiseen (katsauksessa Rubio-Aliaga ym. 2012). Metabolomiikan avulla pystytään muun muassa analysoimaan ruoan rakenneosia ja niiden aineenvaihduntatuotteita kehon nesteissä ja kudoksissa sekä arvioimaan niiden hyötyosuutta ja metaboliaa, vaikutusta suoliston pieneliöstöön sekä tutkimaan elimistön fysiologista vastetta tiettyihin ruokavalioihin tai ravintoaineisiin (katsauksessa Jones ym. 2012, katsauksessa Llorach ym. 2012). Aikaisemmin ruoan analysointi on perustunut lähinnä sen ravintoarvon arvioimiseen, mihin on käytetty kuutta eri pääluokkaa; hiilihydraatteja, rasvoja, proteiineja, vettä, vitamiineja ja mineraaleja (katsauksessa Astarita & Langridge 2013). Metabolomiikan avulla on kuitenkin pystytty laajentamaan tätä tutkimusta määrittämällä ravinnosta myös tuhansia ei-ravitsemuksellisia aineenvaihduntatuotteita, jotka eivät ole välttämättömiä elämän ylläpitämiseksi, mutta joilla silti on todettu olevan vaikutusta terveyteen ja hyvinvointiin (katsauksessa Manach ym. 2009).

Viime vuosikymmenien aikana on tutkittu paljon ruokavalion, elämäntyylin ja perintötekijöiden vaikutusta ihmisten terveyteen ja riskiin sairastua tiettyihin kroonisiin sairauksiin (O'Sullivan ym. 2011). Ruokavaliolla on todistettu olevan merkittävä vaikutus useiden kroonisten sairauksien, kuten diabeteksen, sydän- ja verisuonitautien, erilaisten syöpien ja ylipainon, synnyssä ja kehittämisessä (Giovannucci ym. 2007, Nettleton ym. 2008, Liu ym. 2009, Julia ym. 2010). Metabolomiikan viimeaikainen käyttö ravitsemustutkimuksessa onkin keskittynyt erityisesti sairauksien ehkäisyyn ja hoitoon oikeanmukaisen ruokavalion tai ravintoaineiden nauttimisen kautta (katsauksessa Astarita & Langridge 2013, katsauksessa O'Gorman & Brennan 2015). Metabolomiikan avulla pystytään myös tunnistamaan yksilöiden välisiä vaihteluita ruokavalion vaatimusten suhteen, mikä saattaa tulevaisuudessa johtaa ”henkilökohtaisen ravitsemuksen” suunniteluun, jolloin ruokavalio voidaan säätää sopivaksi juuri kyseisen yksilön tarpeiden mukaan (katsauksessa German ym. 2005, katsauksessa German ym. 2011).

Viime vuosien aikana ravitsemuksellisten indikaattorimolekyylien tunnistaminen on ollut erityisen mielenkiinnon kohteena (katsauksessa Scalbert ym. 2014). Näiden avulla saadaan tietoa tiettyjen ruokien tai ravintoaineiden nauttimisesta, jolloin niitä voidaan käyttää apuna arvioimaan yksilön ruokavaliota (katsauksessa Scalbert ym. 2014). Tunnistamalla ja vahvistamalla erilaisia indikaattorimolekyyliä, voidaan mahdollisesti pystyä kehittämään terveellisempiä ruokavalioita ja sitä kautta vähentää riskiä sairastua ravitsemusperäisiin sairauksiin (Heinzmann ym. 2010). Jotta tunnistettuja metaboliitteja voitaisiin tulevaisuudessa käyttää indikaattorimolekyyleinä, tulisi yksittäisten kohorttitutkimusten tulokset aina vahvistaa käyttäen alkuperäisiä standardeja ja/tai aikaisemmin julkaistuja ja vahvistettuja tuloksia (katsauksessa Villas-Boas ym. 2007, katsauksessa Gibbons ym. 2015). Näin ei kuitenkaan ole monenkaan aikaisemman tutkimuksen kohdalla tehty, mikä rajoittaa niiden tulosten jatkokäyttöä (katsauksessa O'Gorman & Brennan 2015). Tähän täytyisi tulevaisuudessa kiinnittää enemmän huomiota, jotta alaa saataisiin entisestään kehittymään, eivätkä tulokset jäisi puhtaasti akateemiselle tasolle (katsauksessa O'Gorman & Brennan 2015). Nykyään on jo kehitteillä useita kansainvälisiä tietokantoja ruokien metaboliiteista ja niiden kinetiikasta, kuten FooDB ja PoluPhenol Explorer (katsauksessa Brennan 2013). Tulevaisuudessa parempien tulosten saamiseksi myös koko metabolomin kattavuuden on parannuttava entisestään (katsauksessa Brennan 2013).

Vaikka ravitsemustutkimuksilla onkin pystytty jossain määrin osoittamaan, mitkä ravintoaineet olisivat terveyttä edistäviä, on metaboliittien muutosten tulkinta silti usein hankalaa ja spekuloidavaa (katsauksessa Lampe ym. 2013). Aikaisemmin on keskitytty lähinnä yksittäisten indikaattorimolekyylien määrittämiseen tietyistä ruoka-aineista tai -ryhmistä, mutta tulevaisuudessa pitäisi ottaa käyttöön erilaisia indikaattorimolekyylien yhdistelmiä ja paneeleja, jotka voivat tarjota tarkempia tuloksia ravitsemustutkimuksen parissa (katsauksessa Gibbons ym. 2015). Myös aineenvaihduntareittien kartoituksen ja metaboliittien linkittämisen biologisiin prosesseihin on parannuttava, jotta ruokavalion ja sairauksien välistä yhteyttä pystyttäisiin tulkitsemaan paremmin ja tutkimuksilla olisi enemmän käytännön tarkoitus (katsauksessa Brennan 2013).

2.2 Koiran ruokinta

Koiran ruokia on nykypäivänä saatavilla hyvin monessa eri muodossa (teoksessa Fascetti & Delaney 2012). On kaupallisia kuivaruokia, märkärüüia ja puoli-märkärüüia sekä lukuisia muita vaihtoehtoja, kuten makkaröia, nameja ja välipaloja. (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010). Lisäksi koirille voidaan syöttää kypsennettyä tai raakaa kotiruokaa tai eläinkaupoista saatavia erilaisia raakaruokavalmisteita (teoksessa Fascetti & Delaney 2012). Seuraavassa perehdytään hieman tarkemmin kuivaruokaan ja raakaruokaan, sekä niiden oleellisiin eroihin.

2.2.1 Kuivaruoka

Kuivaruoka on eniten käytetty koiranruokamuoto (Laflamme ym. 2008). Kuivaruokia kutsutaan täysravinnoksi, sillä ne on suunniteltu sisältämään kaikkia koiran tarvitsemia ravintoaineita oikeassa määrin ja oikeassa suhteessa (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010). Kuivaruokien valmistukseen käytetään yleisesti erilaisia viljoja, kuten vehnää tai riisiä, liha-, kala- tai kanajauhoa, mahdollisesti soijaa, perunaa tai muita kasvikunnan tuotteita, usein hiivaa ja lisäksi kivennäis- ja vitamiinivalmisteita (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010, Raditic ym. 2011).

Kuivaruoka valmistetaan tyypillisesti suulakepuristus-menetelmällä (katsauksessa Thompson 2008). Kyseisessä menetelmässä ruokamassa kypsennetään hyvin nopeasti lämmön, paineen ja höyryn avulla, minkä yhteydessä massa samalla muotoillaan tyypilliseen muotoonsa (katsauksessa Thompson 2008). Kuivaruokien onnistuneessa valmistusprosessissa ruoan kuumennus tuhoaa kaikki raaka-aineissa olleet mikrobit

(teoksessa Hellemann & Marjeta 2010). Joissain tapauksissa kuumennuskäsittelyissä saattaa tuhoutua myös arvokkaita ravintoaineita (teoksessa Fascetti & Delaney 2012). Kuumennuksen jälkeen tuote kuivataan ja pakataan valmiisiin pakkauksiin (katsauksessa Thompson 2008). Kuivaruoissa kosteus vaihtelee noin 3-11 % välillä (teoksessa Fascetti & Delaney 2012). Kuivuus onkin juuri se tekijä, mikä tekee ruoasta hyvin säilyvän ja helposti käsiteltävän (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010).

Valkuaisen määrä kuivaruoissa on keskimäärin 22-23 %, mutta vaihtelee sen mukaan, millä ryhmälle ruoka on suunnattu (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010). Valkuaisen määrä ei kuitenkaan vielä kerro kaikkea, vaan on myös yhtä oleellista, mistä lähteistä valkuainen on peräisin (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010). Mikäli valmistuksessa ei ole käytetty juuri eläinperäisiä valkuaisia, kuten liha-, kala-, maksa- tai maitojauhetta, on valkuaisen laatu usein koiralle riittämätön (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010).

Hiilihydraatin lähteinä valmisruoissa voivat toimia esimerkiksi erilaiset viljat, riisi, maissi tai peruna (katsauksessa Thompson 2008). Vaikka hiilihydraatteja ei pidetä aivan välttämättöminä koirille, ne tarjoavat kuitenkin hyvän energian- ja kuidunlähteen lemmikeille (katsauksessa Thompson 2008).

Rasvan pitoisuus kuivaruoissa on yleensä noin 5-10 % (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010). Niitä on oltava välttämättömien rasvahappojen saannin turvaamiseksi, mutta samalla ne ovat myös kriittinen tekijä tuotteen säilyvyyden kannalta (katsauksessa Thompson 2008). Rasvojen härskiintymisen estoon käytetäänkin kuivaruoissa yleisesti antioksidantteja, kuten E-vitamiinia (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010).

Kuivaruokiin lisätään myös vitamiini- ja kivennäisvalmisteita sen mukaan, mitä raaka-aineista jää laskennallisesti puuttumaan (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010). Osa vitamiineista tuhoutuu kuitenkin valmistuksen yhteydessä ja hiljalleen tuotteen säilytysaikana (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010).

2.2.2 Raakaruoka

Raakaruokien käyttö koiran ruokinnassa on viime aikoina kasvattanut suosiotaan (Weese ym. 2005). Raakaruokinta perustuu nimensä mukaisesti raakaravintoon, lähinnä lihan ja luun syöttämiseen (teoksessa Fascetti & Delaney 2012). Lisäksi ruokavalioon voidaan sisällyttää esimerkiksi raakoja kasviksia, hedelmiä ja sisäelimiä (teoksessa Hellemann

& Marjeta 2010). Tällöin koirille ei syötetä mitään teollisia ruokavalmisteita eikä kypsää viljaa (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010). Kasvikset ja hedelmät eivät ole koiralle välttämättömiä ruoka-aineita, mutta niistä on harvoin haittaakaan. Kuidun määrä saattaa myös kasvattaa ulosteen tilavuutta ja sitä kautta ehkäistä muun muassa ummetusta (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010). Koirille on nykyään saatavilla useita kaupallisiakin raakaruokavalmisteita, joissa osassa saattaa olla lisättynä valmiiksi tarvittavat vitamiinit ja kivennäisaineet (teoksessa Fascetti & Delaney 2012). Erään tutkimuksen mukaan myös kaupallisissa raakaruoissakin vitamiini- ja kivennäisainepitoisuuksissa oli kuitenkin suositusten ylittäviä tai alittavia arvoja (Freeman & Michael 2001).

Raakaruoan kannattajat perustelevat raakaruoan käyttöä muun muassa sen edullisilla vaikutuksilla immuunitoimintaan, yleisterveyteen, energiaan, ihon ja turkin kuntoon sekä kroonisiin ruoansulatuskanavan sairauksiin, allergioihin ja metabolisiin sairauksiin (Stogdale & Diehl 2003). Lisäksi se on lähempänä koiran luonnollista ruokavaliota (Weese ym. 2005). Tutkimuksissa ei ole kuitenkaan vielä pystytty todistamaan, että raakaruoalla olisi mitään pitkäaikaisia terveysvaikutuksia muihin ruokatyyppeihin verrattuna (katsauksessa Schlesinger & Joffe 2011).

Sen sijaan raakaruoan käyttöön liittyy tieteellisesti todistettuja riskejä, kuten raaka-aineiden mikrobikontaminaatio tai mahdollisten hivenaineiden puutostilat tai liikasaanti (katsauksessa Schlesinger & Joffe 2011). Teollisissa koiranruoissa on usein riittävästi vitamiineja ja kivennäisaineita, mutta koti- tai raakaruoasta niitä saatetaan saada liian vähän tai liikaa (katsauksessa Schlesinger & Joffe 2011). Tutkimuksissa on esimerkiksi todettu raakaruokinnan aiheuttaneen nuorille pennuilla ravitsemuksellista osteodystrofiaa ja sekundaarista kilpirauhasen vajaatoimintaa kalsiumin ja jodin tasapainohäiriöiden seurauksena (Kawaguchi ym. 1993, DeLay & Laing 2002). Eräässä tutkimuksessa havaittiin erilaisten raakaruokien analyysissa muun muassa suositusarvoihin nähden liian matalia kalsiumtasoja, virheellisiä kalsium-fosfori suhteita, matalia A- ja D-vitamiinitasoja sekä matalia jodin, sinkin ja kuparin pitoisuuksia (Dillitzer ym. 2011).

Tutkimuksissa on todistettu useita tapauksia, joissa ruokavälitteisiä tauteja on siirtynyt lemmikeistä ihmisiin (Gutman ym. 1973, Sato ym. 2000). Näitä potentiaalisia ihmispatogeeniä on eristetty niin kaupallisista kuin kotivalmisteisista raakaruoista.

Erityisesti salmonellaa on tutkittu ja todettu raakaruosta useissakin tutkimuksissa, joissa puolestaan teollisista kuivaruoista sitä ei ole havaittu (Chengappa ym. 1993, Joffe & Schlesinger 2002). Lisäksi raakaruosta on löydetty muun muassa *E. colia*, *C. perfringensia*, *S. aureusta* ja *C. difficileä* (Weese ym. 2005, Strohmeyer ym. 2006). Tartunnan voi saada välillisesti koiran kautta esimerkiksi käsittelemällä sitä, sen ulosteita tai tarvikkeita, kuten ruoka- ja vesikuppia, tai suoraan raaka-aineista niiden käsittelyn seurauksena tai ristikontaminaationa esimerkiksi keittiövälineiden tai säilytyksen kautta (teoksessa Fascetti & Delaney 2012).

Lisäksi muun muassa luiden syöttämisestä saattaa seurata terveysriski, mikäli sirpaleet aiheuttavat suoliston seinämiin vaurioita (teoksessa Fascetti & Delaney 2012). Naudan ja hirvieläimen luiden holvimainen rakenne ehkäisee luiden palasten tarttumisen suoliston seinämään, mutta linnun ja sian luut puolestaan hajoavat sälöiksi ja voivat siten jopa puhkaista suolen seinämän (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010). Kovien, raakojen luiden pureskelu saattaa myös aiheuttaa hampaisiin vaurioita ja jopa niiden lohkeamisia (teoksessa Fascetti & Delaney 2012). Monissa kaupallisissa raakaruoissa luut on tosin valmiiksi jauhettu ruokamassan sekaan, jolloin edellä mainittua riskiä ei synny (teoksessa Fascetti & Delaney 2012).

Mikäli raakaruokaa koiralleen syöttävä omistaja on huolellisesti perehtynyt ruokinnan erityisvaatimukseen, voi raakaruokaa syövä koira kuitenkin saada varsin monipuolista, luonnonmukaisempaa ja virikkeellisempää ruokaa, ilman elintarvikkeiden lisäaineita ja kemikaaleja (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010).

2.2.3 Kuiva- ja raakaruonan merkittävimmät erot

Koiran aineenvaihdunnan kannalta raakaruonan ja kuivaruoan välinen merkittävin ero lienee niiden ravintoainekoostumuksissa. Raakaruoissa energian päälähteenä toimii yleensä liha ja siitä saatava rasva ja proteiini, kun taas kuivaruoissa on usein käytetty energian lähteenä enemmän tai vähemmän myös hiilihydraatteja (teoksessa Fascetti & Delaney 2012). Kuivaruoissa rasvan määrä pyritään pitämään suhteellisen pienenä ruoan paremman säilymisen takaamiseksi (katsauksessa Thompson 2008). Myös proteiinien lähteissä saattaa olla eroja raaka- ja kuivaruoan välillä, sillä esimerkiksi kuivaruoissa lihapitoisuus saattaa olla raakaruokaa pienempi ja niihin on usein käytetty enemmän kasvikunnantuotteita kuin raakaruokaan (teoksessa Hellemann & Marjeta

2010). Koska kaupallisia kuivaruokia on kuitenkin tehty moniin eri käyttötarkoituksiin, vaihtelevat myös niiden ravintosisällöt hyvinkin laajasti (teoksessa Fascetti & Delaney 2012), jolloin niiden vertaaminen raakaruokaan yleisellä tasolla on hieman vaikeaa.

Kuiva- ja raakaruoka eroavat suuresti myös valmistustavaltaan. Kuivaruoaassa bakteerikontaminaation riski on kuumennuskäsittelyn vuoksi huomattavasti pienempi kuin raakaruoaassa (Chengappa ym. 1993, Joffe & Schlesinger 2002), mikä saattaa vaikuttaa osaltaan myös koiran ruoansulatukseen, immuunipuolustukseen ja suoliston omaan pieneliökantaan. Kuumennuskäsittelyn seurauksena kuivaruoaasta saattaa myös tuhoutua joitain arvokkaita ravintoaineita, mutta toisaalta osa niistä saattaa taas tulla helpommin käytettävään muotoon (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010, teoksessa Fascetti & Delaney 2012). Yleisesti ottaen raakaruokaa pidetään kuitenkin hyvin sulavana ja sen biologista hyötyosuutta suurena (teoksessa Fascetti & Delaney 2012).

Lisäksi yksi merkittävä tekijä kuiva- ja raakaruokaa vertaillessa on raakaruokaan liittyvät mahdolliset vitamiinien ja hivenaineiden puutokset tai liikasaannit.

Kuivaruokiin on valmiiksi lisätty oikeat määrät ja suhteet kaikkia vaadittavia vitamiineja ja hivenaineita (teoksessa Hellemann & Marjeta 2010), mutta erityisesti kotona valmistetussa raakaruoaassa saattaa olla näiden suhteen tasapainohäiriöitä (Kawaguchi ym. 1993, DeLay & Laing 2002, Dillitzer ym. 2011). Nykyisin on kuitenkin saatavilla myös raakaruoista useita kaupallisia vaihtoehtoja, joihin on lisätty puuttuvia vitamiineja ja hivenaineita, jolloin myös näiden tasapainohäiriöiden riski pienenee (teoksessa Fascetti & Delaney 2012).

2.3 Koiran atooppinen ihottuma

Koiran atooppinen ihottuma on monitekijäinen allerginen ihosairaus, jota on arvioitu sairastavan noin 10% koirista (Lund ym. 1999, Halliwell 2006). Se onkin yleisin kaikista koirien allergisista sairauksista (Scott & Paradis 1990, Carlotti & Costargent 1994) ja sitä esiintyy tietyillä roduilla, kuten valkoisilla länsiylämaanterriereillä, labradorinnoutajilla, kultaisilla noutajilla, ranskanbulldogeilla ja bullterriereillä, enemmän kuin muilla (Zur ym. 2002, Picco ym. 2008).

2.3.1 Patogeneesi

Koirien atooppinen ihottuma on määritelty sairautena, johon liittyy IgE-välitteinen yliherkkyyssreaktio ympäristön allergeeneja vastaan (Halliwell 2006). Sen syntyyn vaikuttavat kuitenkin useat eri tekijät, niin geneettiset kuin ympäristöperäisetkin, mistä syystä sen patogeneesi on edelleen hieman epäselvä (teoksessa Scott ym. 2001).

Tämän hetkisen hypoteesin mukaan koiran atooppisen ihottuman patogeneesiin vaikuttavat ennen kaikkea ihon läpäisyesteen vaillinainen toiminta sekä normaalista poikkeava immunologinen vaste, joita kohtaan atooppisilla koirilla on usein geneettinen alttius (katsauksessa Marsella ym. 2012). Tutkimuksissa onkin löydetty jo useita geenejä ja geenialueita, joiden ilmentymisen on todettu olevan poikkeavaa atooppista ihottumaa sairastavilla koirilla (Merryman-Simpson ym. 2008, Wood ym. 2009, Plager 2012).

Ihmisillä ihon puutteellisen läpäisyesteen on todettu olevan merkittävä tekijä atooppisen ihottuman kehittymisessä (katsauksessa Cork ym. 2009) ja siksi sitä on koirillakin tutkittu paljon viime vuosina. Tutkimuksissa onkin todettu sekä rakenteellisia että toiminnallisia puutoksia. Rakenteellisia puutoksia ovat muun muassa olleet stratum corneumin laajentuneet soluvälit, keramidi-sfingolipidien vähäisemmät pitoisuudet ja rasvalamellien rakennemuutokset (Inman ym. 2001, Reiter ym. 2009, Shimada ym. 2009, Yoon ym. 2011). Toiminnallisesti on puolestaan todettu, että atooppisilla koirilla ihon kautta haihtuvan veden määrä on suurempi, myös terveen ihon alueilta (Shimada ym. 2009).

Puutteellisen ihon läpäisyesteen seurauksena koira on herkempi altistumaan ympäristön allergeeneille (katsauksessa Marsella & Girolomoni 2009). Ympäristön allergeenit joutuvat ihon välityksellä kosketuksiin epidermisen Langerhansin solujen kanssa, jotka esittelevät antigeenit ihon paikallisissa imusolmukkeissa T-soluille, jotka puolestaan aktivoituvat tällöin Th2-soluiksi (katsauksessa Olivry ym. 2005). Atooppisilla koirilla on todistettu olevan epänormaalin korkea Th2-solujen säätelemä sytokiinivaste, jossa interleukiini-4 on yliedustettuna (Olivry ym. 1999, Nuttall ym. 2002b). IL-4 puolestaan aktivoi B-soluja muuttumaan plasmasoluiksi, jolloin IgE-vasta-aineiden muodostus kiihtyy (Mosmann ym. 1986). IgE-vasta-aineet sitoutuvat mast-soluihin, jolloin ne degranuloituvat ja aiheuttavat tulehdusreaktion ihossa (Jackson ym. 1996). T-solujen

vapauttamat sytokiinit johtavat puolestaan kutinan aiheutumiseen ja sitä kautta itseaiheutettujen ihovaurioiden syntyyn (katsauksessa Marsella ym. 2012). Nämä yhdessä sekundaaristen tulehdusten kanssa johtavat Th1-välitteisen inflammaation syntyyn taudin kroonisessa vaiheessa (Nuttall ym. 2002a).

Yleisin altistumisreitti ympäristön patogeeneille on ihon kautta, mutta altistumista tapahtuu jossain määrin myös hengitysteiden ja ruoansulatuskanavan välityksellä (Marsella ym. 2006). Tyypillisimpiä allergeenejä atooppisilla koirilla ovat muun muassa pöly- ja varastopunkit, siitepölyt, homesienten itiöt ja eläinhilseet (katsauksessa Hill & DeBoer 2001)

2.3.2 Oireet

Atooppinen ihottuma puhkeaa koirille yleensä nuorena, tyypillisesti noin 6 kuukauden – 3 vuoden iässä (teoksessa Scott ym. 2001). Ensimmäisenä oireena esiintyy yleensä kutinaa, jonka seurauksena koiralle tulee monesti itse aiheutettuja ihovaurioita, kuten hankaumia, karvattomuutta sekä ihon paksuuntumista ja pigmentoitumista (teoksessa Gross ym. 2005). Ihovaurioihin liittyy myös usein sekundaarisia ihon bakteeri- ja hiivatulehduksia (McEwan 2000, katsauksessa Olivry ym. 2005, Fazakerley ym. 2009). Myös toistuvia ulkokorvantulehduksia saattaa esiintyä, ja harvemmillä koirilla allergista nuhaa tai sidekalvontulehduksia (katsauksessa Olivry ym. 2010). Tyypilliset alueet ihomuutoksille ovat mahanalus, kainalot, nivuset, peräaukon ympärys, raajat ja erityisesti tassunalue sekä naaman alueelta suun ja silmien ympärys sekä korvalehdet (Prélaud & Power 2008).

2.3.3 Diagnostiikka ja hoito

Koiran atooppiselle ihottumalle ei ole olemassa mitään spesifistä testiä, vaan diagnoosi perustuu ensisijaisesti kattavan potilashistorian selvittämiseen sekä muiden kutinaa aiheuttavien sairauksien, kuten ulkoloisinfektoiden, ihotulehdusten ja muiden allergisten sairauksien, poissulkemiseen (katsauksessa Olivry ym. 2010). Diagnostiikan apuna voidaan lisäksi käyttää siihen erityisesti laadittuja diagnostisia kriteerejä, joiden avulla kartoitetaan, kuinka paljon potilaalla on taudille tyypillisiä oireita (Favrot ym. 2010). On myös olemassa ihonsisäisiä ja serologisia allergeetitestejä, joiden avulla pystytään määrittämään ne allergeenit, joille koira on herkistynyt. Tätä tietoa voidaan käyttää esimerkiksi siedätyshoitojen suunnittelemiseen tai sairauden hallintaan

estämällä tai minimoimalla koiran altistuminen kyseisille allergeeneille (katsauksessa Olivry ym. 2010) .

Koiran atooppinen ihottuma on parantumaton sairaus, jonka hoito keskittyy lievittämään oireita tai parhaassa tapauksessa pitämään ne poissa, jotta koiran elämänlaatu säilyisi mahdollisimman hyvänä (katsauksessa Nuttall ym. 2013). Hoitoon kuuluu muun muassa todettujen allergeenien välttäminen, siedätyshoidot, sekundaaristen bakteeri- ja sienitulehdusten hoito, kutinaa vähentävät systeemi- ja paikallislääkitykset sekä ihon ja korvien kunnosta huolehtiminen (katsauksessa Olivry ym. 2010). Lisäksi joillain lisävalmisteilla, kuten rasvahappo- ja E-vitamiinilisillä on todettu olevan myönteisiä vaikutuksia koirien atooppisen ihottuman hoidossa (Bensignor ym. 2008, Plevnik ym. 2014).

2.4 Lisätutkimuksen tarve

Koska koiran atooppinen ihottuma on monitekijäinen sairaus, jonka patogeneesiä ei vielä täysin tunneta (teoksessa Scott ym. 2001, Halliwell 2006), vaaditaan aiheen tiimoilta jatkuvasti lisätutkimuksia, joiden avulla pystyttäisiin yhdistämään tietoa esimerkiksi altistavien perintötekijöiden sekä immuunipuolustuksen ja aineenvaihdunnan häiriöiden välillä. Useilla atopian hoitoon käytetyillä systeemilääkkeillä on runsaasti sivuvaikutuksia (teoksessa Scott ym. 2001), jolloin myös parempia hoitovaihtoehtoja pyritään jatkuvasti kehittämään. Kuten aikaisemmin jo mainittiin, joidenkin lisäravinteiden on todettu vaikuttavan myönteisesti atopian hallinnassa muun muassa parantamalla ihon kuntoa (Bensignor ym. 2008, Plevnik ym. 2014), mutta ruokavalion vaikutuksen laajempi tutkimus atopian hoidossa olisi edelleen tarpeen. Tällöin pystyttäisiin tulevaisuudessa mahdollisesti vähentämään lääkitysten tarvetta vain ruokavaliota korjaamalla, jolloin myös haitallisten sivuvaikutusten määrä vähenisi ja hoito olisi luonnonmukaisempaa. Lisäksi atooppisen koiran hoidonsuunnittelu on kaiken kaikkiaan hyvin potilaskohtaista, sillä yksilöiden välillä voi olla suuriakin eroja muun muassa taudin vakavuuden ja lääkitysten hoitovasteiden osalta (teoksessa Scott ym. 2001). Koska metabolomiikan avulla pystytään hyvin ottamaan huomioon yksilöiden välisiä eroavaisuuksia, voisi se tulevaisuudessa soveltua hyvin myös tämän aihealueen tarkempaan tutkimiseen ja sitä kautta parantaa atopian lääkityksen suunnittelua koirilla.

Koska metabolomiikka tarjoaa erittäin varteenotettavan työkalun sairauksien diagnostiikan ja hoitojen kehittämiseen (katsauksessa Serkova ym. 2011), voisi siitä tulevaisuudessa olla hyötyä myös atooppisen ihottuman tutkimisessa. Toistaiseksi atooppiseen ihottumaan liittyviä metabolomiikan tutkimuksia on ihmispuolella tehty hyvin vähän ja koirapuolella ei lainkaan. Assfalg ym. (2012) havaitsivat tutkimuksessaan eroavaisuuksia sairaiden ja terveiden lasten virtsan metaboliittitasoissa. Atooppisilla lapsilla havaittiin kohonneita pitoisuuksia kreatiinissa, kreatiniinissa, sitruunahapossa, formiaatissa, 2-hydroksibyturaatissa, dimetyyliglysiinissa ja maitohapossa verrattuna terveiden lasten virtsaan. Laskeneita pitoisuuksia havaittiin puolestaan betaiinissa, glysiinissä ja alaniinissa (Assfalg ym. 2012). Huang ym. (2014) vertailivat puolestaan atooppisten ja terveiden lasten metaboliitteja seeruminäytteistä ja havaitsivat atooppisilla lapsilla kohonneita pitoisuuksia tyydyttämättömissä rasvahapoissa kun taas eräät konjugoituneiden sappihappojen pitoisuudet olivat laskeneet verrattuna terveisiin. Atooppiset lapset oli edelleen jaettu kahteen ryhmään, joista toisessa lapsilla oli todettu korkeat IgE-pitoisuudet ja toisessa puolestaan normaalit. Korkean IgE:n ryhmässä olevilla lapsilla havaittiin lisäksi kohonneita pitoisuuksia muun muassa sitruunahapossa, maitohapossa, glutamiinihapossa, kenodeoksikoolihapossa, L-asparagiinihapossa, aminovoihapossa, kreatiniinissa, karnitiinissa, sfingomyeliineissä ja useissa tyydyttymättömissä rasvahapoissa. Normaalin IgE:n ryhmässä havaittiin puolestaan laskeneita pitoisuuksia muun muassa joissain aminohapoissa, kuten arginiinissa ja asetyylivaliininissa. Huang ym. (2014) pitivät muun muassa kohonneita maitohapon, karnitiinien ja vapaiden rasvahappojen pitoisuuksia merkinä energia-aineenvaihdunnan häiriöistä ja laskeneita sappihappopitoisuuksia puolestaan merkinä tulehdusprosessista sekä epänormaalista sappihappometaboliasta atooppisilla lapsilla (Huang ym. 2014).

Ravitsemustieteen tutkimuksiin metabolomiikkaa on sen sijaan käytetty jo enemmänkin (katsauksessa Griffiths ym. 2010). Koirilla ei ole aikaisemmin verrattu raakaruogan ja kuivaruoan vaikutuksia elimistön metaboliittitasoihin, mutta jonkin verran niin eläin- kuin ihmispuolellakin on tehty tutkimuksia erityyppisten ruokavalioiden vaikutuksesta isännän metabolomiin. Tutkimuksia on tehty plasman tai seerumin lisäksi myös muun muassa virtsasta. Proteiinipitoisia ruokavalioita on tutkittu suhteellisen paljon ja erityisesti lihapitoisten ruokavalioiden tyypillisimmiksi indikaattorimolekyyleiksi on useissa tutkimuksissa tunnistettu muun muassa kreatiniini, kreatiini, trimetyyliamiini-

typpioksidi (TMAO) ja karnitiini (Stella ym. 2006, Xu ym. 2010, Rasmussen ym. 2012). Kasvispitoisten ruokavalioiden yhteydessä on havaittu kohonneita pitoisuuksia muun muassa hippuraatin, sitraatin ja N-asetyyli glykosamiinin kohdalla, ja laskeneita pitoisuuksia puolestaan tauriinin, fenyylialaniinin, formiaatin ja 3-metyylihistidiinin kohdalla (Xu ym. 2010). Hiilihydraatti- ja rasvapitoisten ruokavalioiden vaikutusta isännän metaboliittitasoihin ei ole tutkittu yhtä paljon kuin proteiinipitoisia ruokavalioita eikä niillä ole havaittu olevan yhtä suuria vaikutuksia. Vester ym. (2009) havaitsivat hiilihydraattipitoista ruokaa syöneillä kissanpennuilla suoritettussa tutkimuksessaan kohonneita veren leptiini pitoisuuksia verrattuna proteiinipitoista ravintoa saavaan kontrolliryhmään. Bertram ym. (2012) puolestaan tutkivat hiilihydraatti- ja rasvapitoisen ruokavalion vaikutusta rottien maksan metaboliittitasoihin ja havaitsivat, että ravinnon korkea hiilihydraattipitoisuus nosti maksan glukoosi- ja laktaattipitoisuuksia, kun taas ravinnon korkea rasvapitoisuus nosti maksan betaiini- ja laktaattipitoisuuksia. Pieper ym. (2012) eivät puolestaan havainneet tekemässään tutkimuksessa merkitseviä eroja sikojen virtsan metaboliittitasoissa hiilihydraattipitoista ruokaa syöneiden ja kontrolliryhmän välillä.

Aikaisemmin tehdyissä tutkimuksissa on käytetty vaihtelevasti eri näytetyyppejä, eri eläinlajeja tai ihmistä sekä erilaisia tutkimusasetelmia, mikä tulee ottaa huomioon aikaisempien tulosten soveltamisessa oman tutkimuksemme tuloksiin.

3 AINEISTO JA MENELMÄT

3.1 Koirat

Tutkimukseen käytettävät koirat olivat osa isompaa staffordshirenbullterrierien ruokintatutkimusta, johon otettiin mukaan kaiken kaikkiaan 46 staffordshirenbullterrieriä, joista osa oli terveitä ja osa atooppista ihottumaa sairastavia. Metabolomiikan tutkimuksessa käytettiin yhteensä 22 suomalaista staffordshirenbullterrieriä. Koirat asuivat tutkimuksen ajan omistajiensa luona eri puolella Suomea. Koirat oli jaettu kuivaruokaa syövien ryhmään ja raakaruokaa syövien ryhmään. Koirat tutkittiin kahdessa erässä, joista ensimmäinen sisälsi ainoastaan atooppisia ja toinen sekä atooppisia että terveitä koiria. Oman tutkielmani aihe on rajattu ensimmäiseen, vain atooppisia koiria sisältävään erään, jossa koiria oli yhteensä

kahdeksan. Taulukossa 1 on esitetty koirien sukupuoli-, ikä- ja painojakaumat ruokaryhmittäin. Lisäksi on esitetty, millä ruokavaliolla koirat olivat ennen ruokintakoetta. Tutkimuksen ajan kuivaruokaa syövien koirien ryhmässä keski-ikä oli 4,5 vuotta ja raakaruokaa syövien ryhmässä 3,5 vuotta. Koirien keskipaino ennen ruokintakoetta oli kuivaruokaa syövien ryhmässä 18,6 kg ja raakaruokaa syövien ryhmässä 19,2 kg. Ruokintakokeen jälkeen vastaavat lukemat olivat 19,2 kg ja 19,8 kg.

Ruokintatutkimuksessa tutkitaan oman tutkielmani aiheen lisäksi myös ulostenäytteiden suolistoflooraa, geenitoimintaa ihokoepaloista ja verinäytteistä sekä mahdollisia atooppisen ihottuman kandidaattigeenejä, veren hiven- ja kivennäisaine- sekä rasvahappo- ja vitamiiniprofiileja sekä karvanäytteiden hiven- ja kivennäisaineprofiileja. Tuloksia verrataan sekä sairaiden ja terveiden että eri ruokintaryhmien välillä. Tutkimusta varten oli suoritettu laaja kysely internetissä, jolla kerättiin tietoa muun muassa koirien perustietojen lisäksi niiden historiasta, elinympäristöstä ja elintavoista, ruokintatottumuksista, mahdollisesta ruokintaan liittyvästä oireilusta tai aikaisemmin diagnosoiduista sairauksista. Tämän kyselyn pohjalta valittiin tutkimukseen mahdollisesti soveltuvat staffordshirenbulldogit, joiden omistajille tarjottiin mahdollisuutta osallistua tutkimukseemme täyttämällä esitietokysely. Esitietokyselyssä selvitettiin vielä tarkemmin koirien ruokintatottumuksia, mahdollisia iho- ja ruoansulatuskanavaoireita sekä mahdollisia aikaisempia diagnooseja, allergiatestituloksia ja lääkityksiä.

Tutkimuksella oli koe-eläinlupa ELLA 15.5 2013, PH702A, No. ESAVI/3244/04.10.07/2013.

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytettyjen koirien sukupuoli-, ikä- ja painojakaumat ruokaryhmittäin sekä koirien ruokavalio ennen ruokintakokeen alkua. Ennen ruokintakoetta koirien katsottiin kuuluvan raakaruokaa syöviin, mikäli niiden ruokavaliosta yli 20 % koostui raakaruosta, tai kuivaruokaa syöviin, mikäli niiden ruokavaliosta alle 20 % koostui raakaruosta.

Ruokavalio ruokintakokeessa	Koira (ID-nro)	Koiran sukupuoli	Koiran ikä (v)	Paino (kg) baseline	Paino (kg) loppukäynti	Ruokavalio ennen ruokintakoetta
Kuivaruoka	6	uros	6	17,6	16,9	Kuivaruoka
Kuivaruoka	16	uros	2,5	23,0	23,2	Raakaruoka
Kuivaruoka	30	naaras	3	15,4	17,0	Raakaruoka
Kuivaruoka	49	naaras	7	18,4	19,6	Kuivaruoka
Raakaruoka	23	uros	1	18,5	18,3	Kuivaruoka
Raakaruoka	26	uros	7,5	16,0	16,8	Raakaruoka
Raakaruoka	43	uros	2,5	21,5	22,5	Raaka/Kuiva
Raakaruoka	45	uros	3,5	20,6	21,6	Kuivaruoka

3.2 Käynnit

Koirat kävivät Yliopistollisessa eläinsairaalassa yhteensä kolmella tutkimuskäynnillä. Ensimmäiset käynnit ajoittuivat vuoden 2013 huhti-elokuulle, ja näiden käyntien yhteydessä valittiin tutkimukseen soveltuvat koirat ja karsittiin pois epäsovit. Ensimmäisellä käynnillä koirille suoritettiin eläinlääkärin toimesta yleistutkimus ja dermatologinen tutkimus, täytettiin ihomuutoksista CADESI-kaavake (Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index) ja otettiin verinäytteet sekä ihosta karva-, teippi- ja raapenäytteet. Verinäytteitä kerättiin 1 ml:n, 3 ml:n ja 9 ml:n EDTA-, 3 ml:n ja 9 ml:n lithium-hepariini-, yhteen PAXGene- sekä kahteen 9 ml:n seerumi-putkeen. Ihon karva- ja raapenäytteet tutkittiin ulkoloisinfektioiden varalta ja teippinäytteistä katsottiin sytologia mahdollisten bakteeritulehdusten tai hiivan ylikasvun varalta. Kaikki koirat saivat kotiin lähtiessään Stronghold-ulkoloishäätökuurin kolmesti kahden viikon välein annettavaksi ja aloittivat 6 viikon eliminaatiodieetin kaupallisella hypoallergeenisella ruoalla (Royal Canin Hypoallergenic®). Eliminaatiodieetin jälkeen seurasi kahden viikon altistusjakso koirien vanhalla ruoalla. Tarvittaessa koirille määrättiin antibioottikuurit ihotulehdusten hoitoon, ja tällaiset koirat määrättiin kontrollikäynnille jo 2-3 viikon kuluttua. Lisäksi omistajat toivat koiristaan ulostenäytteet kolmelta käyntiä edeltävältä päivältä. Omistajille annettiin vastaanotolla täytettäväksi kyselykaavakkeet koskien koirien esitietoja ja tarkempia kutina-oireita sekä VAS-kaavake (Visual analog scale) kutinan voimakkuutta kuvaamaan. Lisäksi omistajille

annettiin kotiin kahden viikon välein täytettäväksi oireita ja kutinan voimakkuutta kuvaavat kaavakkeet.

Koirien toinen käynti eli ns. baseline-käynti ajoittui vuoden 2013 syys-lokakuulle, kunnes koirien eliminaatiodieetti oli päättynyt. Toisella käynnillä koirille tehtiin jälleen eläinlääkärin toimesta yleistutkimus ja dermatologinen tutkimus, täytettiin CADESI-kaavake sekä kanyloitiin ja otettiin verinäytteet. Tämän jälkeen koirat rauhoitettiin ja niille tehtiin intradermaalinen allergeestesti (Greer®) sekä otettiin ihokoepalat vasemmasta kainalosta. Joidenkin koirien kohdalla ihokoepaloja tai allergeestestejä ei voitu tehdä niiden hiljattain saamien glukokortikoidi-, siklosporiini- tai antihistamiinihoitojen takia. Omistajat täyttivät käynnin yhteydessä jälleen kyselykaavakkeet koiran sen hetkisistä oireista ja kutinan voimakkuudesta sekä lisäksi kyselykaavakkeen koskien koiran pentuajan asuinympäristöä ja lääkityksiä. Omistajat toivat koiristaan myös uudet kolmen päivän ulostenäytteet.

Toisen käynnin jälkeen koirat jaettiin kuivaruokaa ja raakaruokaa syövien ryhmiin. Kuivaruokaa syövien ryhmässä kaikki koirat söivät Hill's Science Plan™ Canine adult sensitive skin with chicken –kuivaruokaa, kun taas raakaruokaa syövien koirien ryhmässä koirat söivät kaupallista MUSH BARF Vaisto® sika-kalkkuna-lammas ja/tai MUSH BARF Vaisto® nauta-kalkkuna-lohi raakaruokaa. Ruokien ravintoainekoostumukset on esitetty taulukoissa 2, 3 ja 4, ja niiden alle on listattu kunkin ruoan raaka-ainesisältö. Koirat pysyivät tällä samalla ruokavaliolla 4-5 kuukautta, minkä jälkeen ne tulivat viimeiselle käynnille. Mikäli omistajat olivat poikenneet ruokavaliosta, oli heitä neuvottu kirjoittamaan annettuun kalenteriin ylös kaikki sallitun ruokavalion ulkopuoliset ainesosat. Samoin kaikista annetuista lääkkeistä tuli pitää kirjaa.

Viimeiselle käynnille koirat tulivat vuoden 2014 helmi-maaliskuun aikana, jolloin koirille tehtiin samat toimenpiteet kuin toisella käynnilläkin. Lisäksi omistajat toivat jälleen uudet ulostenäytteet ja täyttivät samat kaavakkeet oireisiin liittyen kuin aikaisemmin. Viimeisellä käynnillä omistajat saivat täytettäväksi lisäksi kaavakkeet koskien koirien stressiä.

Taulukko 2. Hill's Science Plan™ Canine adult sensitive skin with chicken –ruoan ravintoainekoostumus (Hill's 2015).

Ravintoaineet	per 100 g	%	% kuiva-aineesta
Energia	1592 kJ/380 kcal		
Proteiini	25,2 g	25,2	27,4
Rasva	15,8 g	15,8	17,2
Hiilihydraatit	45,2 g	45,2	49,1
Raakakuitu	1,2 g	1,2	1,3
Tuhka	4,9 g	4,9	5,3
Kosteus	8 g	8,0	
Kalsium	0,72 g		
Fosfori	0,65		

Hill's Science Plan™ Canine adult sensitive skin with chicken –ruoan ainesosat: riisi, maissi, kana (22 %) ja kalkkuna (yhteensä siipikarjaperäisiä tuotteita 33 %), maissigluteeni, kuivattu kananmuna, kasvisöljy, pellavansiemen, ruoansulatusta edistävä aines, eläinrasva, mineraalit, DL-metioniini, L-lysiini, L-tryptofaani, vitamiinit, jäännöstuhka ja beetakaroteeni. Säilöntään on käytetty luonnollisia antioksidantteja, rosmariiniuutetta ja sitruunahappoa (Hill's 2015).

Taulukko 3. MUSH BARF Vaisto® Kalkkuna-kana-lammas –ruoan ravintoainekoostumus (MUSH 2015a).

Ravintoaineet	per 100 g	%	% kuiva-aineesta
Energia	992 kJ/237 kcal		
Proteiini	14,20 g	14,2	34,6
Rasva	20,00 g	20,0	48,8
Raakakuitu	0,60 g	0,6	1,5
Tuhka	6,20 g	6,2	15,1
Kosteus	59,00 g	59,0	
Kalsium	2,24 g		
Fosfori	1,15 g		

MUSH BARF Vaisto® Kalkkuna-kana-lammas –ruoan ainesosat: kalkkuna 40% (liha, luu, rusto), broileri 35% (liha, luu, kivipiira, nahka, sydän, rusto, maksa), lammas 20% (luu, liha, keuhko, rusto, maksa), kasvis 5% (pinaatti, parsakaali, lehtisalaatti, kylmäpuristettu auringonkukkaöljy), kananmuna < 1% (MUSH 2015a).

Taulukko 4. MUSH B.A.R.F. Vaisto® Nauta-kalkkuna-lohi –ruoan ravintoainekoostumus (MUSH 2015b).

Ravintoaineet	per 100 g	%	% kuiva-aineesta
Energia	853 kJ/204 kcal		
Proteiini	15,00 g	15,0	42,5
Rasva	15,80 g	15,8	44,8
Raakakuitu	0,80 g	0,8	2,3
Tuhka	3,70 g	3,7	10,5
Kosteus	64,70 g	64,7	
Kalsium	0,45 g		
Fosfori	0,34 g		

MUSH B.A.R.F. Vaisto® Nauta-kalkkuna-lohi –ruoan ainesosat: nauta 47 % (maha, liha, keuhko, sydän, rusto, maksa), kalkkuna 38 % (liha, luu, rusto), lohi 10 % (lohi ruotoineen) kasvis 5% (parsakaali, lehtisalaatti, omena, porkkana, kylmäpuristettu auringonkukkaöljy, camelinaöljy) (MUSH 2015b).

3.3 Näytteet

Verinäytteet otettiin V. jugulariksesta tai kanyloinnin yhteydessä V. cephalicasta. Metabolomiikan tutkimukseen käytettiin 9 ml:n seerumiputkea, joka suojattiin luonnonvalolta välittömästi näytteenoton jälkeen, seisotettiin 30 minuuttia huoneenlämmössä ja sentrifugoitiin 3500 rpm 15 minuutin ajan. Tämän jälkeen eroteltu seerumi pipetoitiin kahden millilitran Eppendorf-putkiin ja pakastettiin -80°C:ssa.

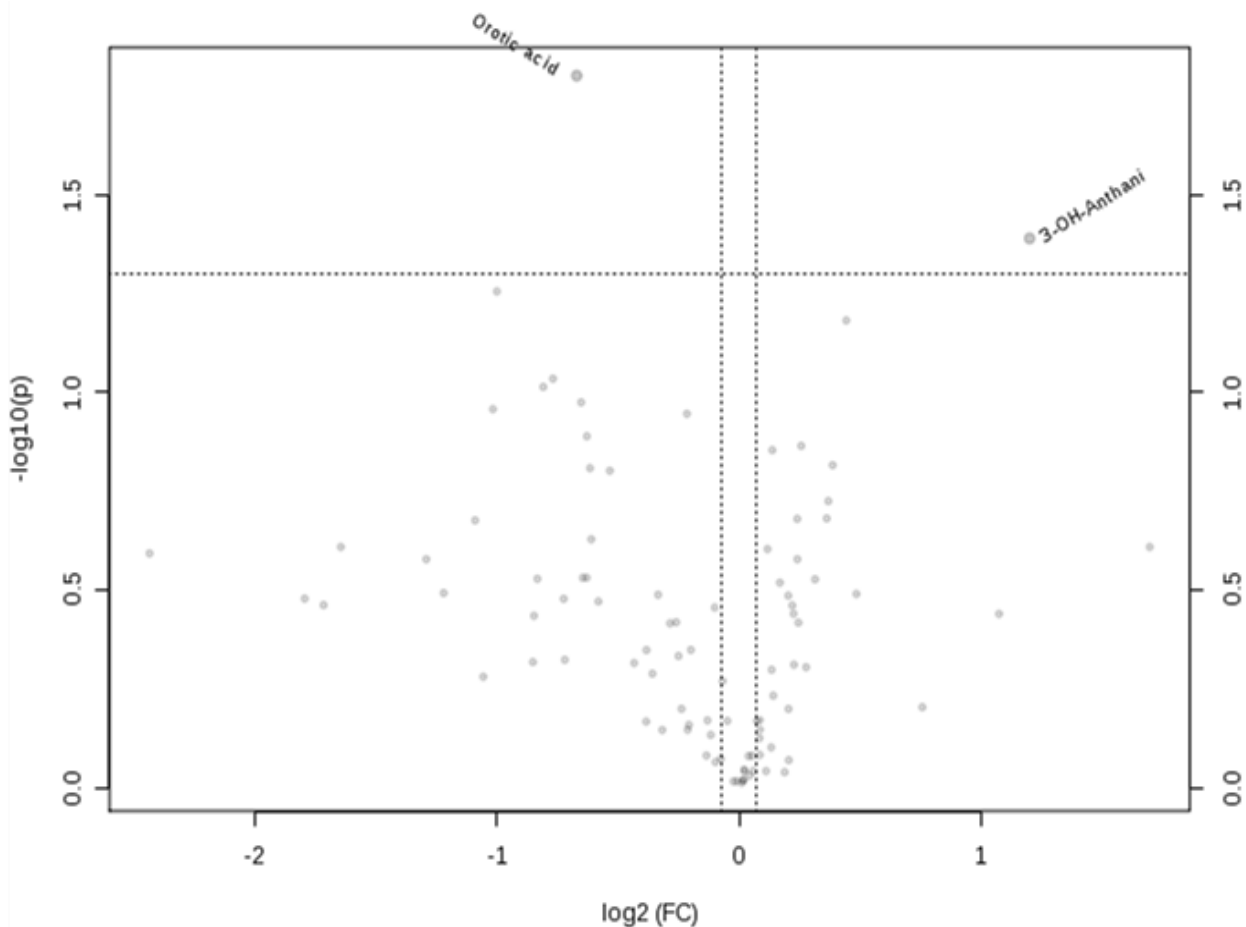
3.4 Analyysimenetelmät ja tilastolliset menetelmät

Näytteet analysoitiin Finnish Institute of Molecular Medicine –laboratoriossa (FIMM) massaspektrometriaan perustuvaa UPLC-MS/MS-menetelmää käyttäen. Metaboliittien profiloinnissa määritettiin 102 polaarista metaboliittia. Datan käsittelyyn käytettiin monimuuttuja-analyyseina pääkomponenttianalyysia ja osittaista pienimmän neliösumman erotteluanalyysia ja p-arvot laskettiin yhden muuttujan regressioanalyysilla.

4 TULOKSET

4.1 Lähtötilanne

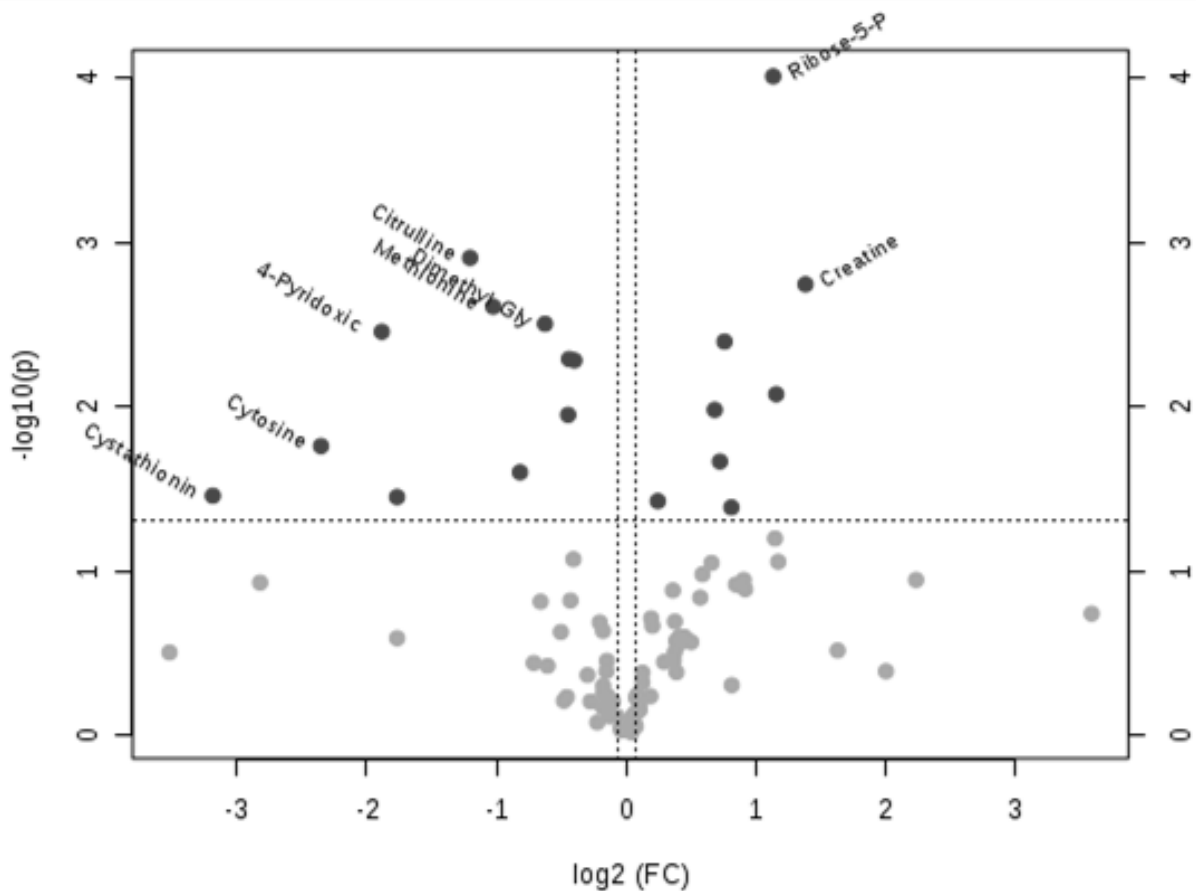
Ensimmäisellä käynnillä, ennen ruokintakoetta otetuista seeruminäytteistä määritetyt 102 metaboliittia olivat pitoisuuksiltaan jakaantuneet tasaisesti molempien ruokintaryhmien välillä eikä tilastollisesti merkitseviä eroja löytynyt kuin kahden metaboliitin kohdalla (kuva 1).



Kuva 1. Kuvaajassa nähdään tulokset ennen ruokintakokeen alkua. Kuvaajaan on merkitty pistein kaikki määritetyt metaboliitit. X-akselilla esitetty FC-arvo (fold change) kuvaa pitoisuuksissa tapahtuneiden muutosten moninkertaisuutta ja suuntaa. Y-akselilla on puolestaan esitetty tulosten logaritminen p-arvo. Poikittainen katkoviiva osoittaa p-arvoa 0,05 ja sen yläpuolella olevat metaboliitit ovat olleet p-arvoltaan tätä pienempiä. Näin ollen ainoastaan kahden metaboliitin kohdalla havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero ryhmien välillä ennen ruokintakokeen aloittamista. Erot muiden metaboliittien välillä eivät olleet tilastollisesti merkitseviä.

4.2 Tulokset ruokintakokeen jälkeen

Ruokintakokeen jälkeen viimeisellä käynnillä otetuissa verinäytteissä seerumin metaboliittitasoissa havaittiin sen sijaan selvää vaihtelua eri ruokaryhmien välillä. 19 eri metaboliitin kohdalla ero oli tilastollisesti merkitsevä. Näistä kahdeksan metaboliitin pitoisuudet olivat koonneet raakaruokaa syövien koirien ryhmässä ja 11 puolestaan laskeneet verrattuna kuivaruokaa syövien koirien ryhmään (taulukko 5 ja kuva 2).



Kuva 2. Kuvaajassa nähdään tulokset ruokintakokeen jälkeen. X-akselilla kuvattu FC-arvo (fold change) kuvaa pitoisuuksissa tapahtuneiden muutosten moninkertaisuutta ja suuntaa, kun taas Y-akselilla kuvattu p-arvo tulosten tilastollista merkitsevyyttä. Poikittaisen katkoviivan yläpuolelle jäävien metaboliittien p-arvo oli alle 0,05, jolloin näiden 19 metaboliitin muutoksia pidettiin tilastollisesti merkitsevinä. Negatiivinen FC-arvo kuvaa metaboliittien laskeneita pitoisuuksia raakaruokaa syövien ryhmässä ja positiivinen arvo puolestaan koonneita pitoisuuksia verrattuna kuivaruokaa syövien ryhmään.

Taulukko 5. Raakaruokaa syövien koirien ryhmässä kohonneet ja laskeneet metaboliittipitoisuudet verrattuna kuivaruokaa syövien koirien ryhmään. Muutokset muissa määritetyissä metaboliiteissa eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. FC-arvo (fold change) kuvaa pitoisuuksissa tapahtuneiden muutosten moninkertaisuutta ja muutos-sarakkeessa on esitetty, onko metaboliitin pitoisuus laskenut vai kohonnut verrattuna kuivaruokaa syövien koirien ryhmään. Tilastollisesti merkitseviksi katsottiin metaboliitit, joiden p-arvo oli alle 0,05.

Metaboliitti	FC-arvo	Muutos	p-arvo
Kystationiini	0,1098	↓	0,034823
Sytosiini	0,1957	↓	0,017380
4-Pyridoksiinihappo	0,2708	↓	0,003496
Kenodeoksikoolihappo	0,2938	↓	0,035493
Sitrulliini	0,4339	↓	0,001240
Metioniini	0,4912	↓	0,002458
Prolini	0,5668	↓	0,025087
Dimetyyliglysiini	0,6475	↓	0,003129
Aminoisovoihappo	0,7327	↓	0,011211
Glysiini	0,7365	↓	0,005126
L-Asparagiinihappo	0,7575	↓	0,005226
Kreatiniini	1,1832	↑	0,037583
Inositoli	1,6035	↑	0,010448
L- α -aminoadipaatti	1,6486	↑	0,021567
Betaiini	1,6897	↑	0,004013
Hypoksantiini	1,7528	↑	0,041028
Riboosi-5-fosfaatti	2,1912	↑	0,000097
Trimetyyliamiini-typpioksidi	2,2272	↑	0,008398
Kreatiini	2,6042	↑	0,001796

5 POHDINTA

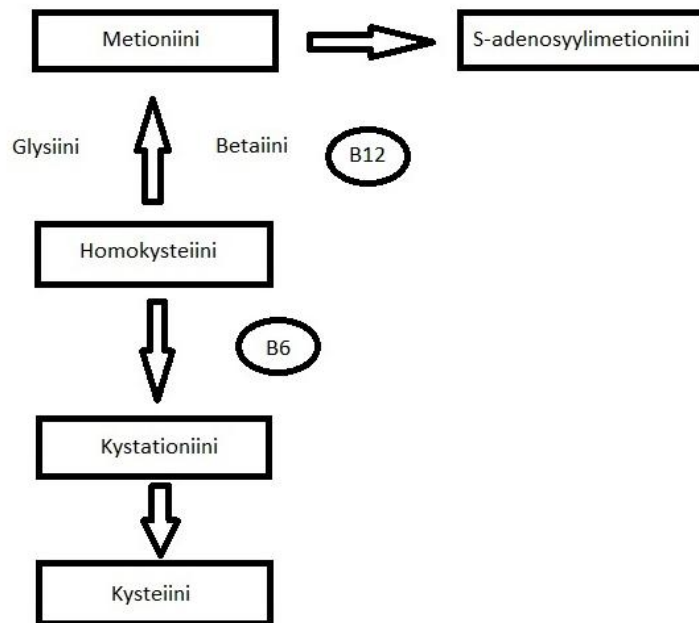
Aikaisemmissa ihmisillä tehdyissä tutkimuksissa on todettu veren kohonneiden kreatiini-, kreatiniini- ja trimetyyliamiini-typpioksidipitoisuuksien liittyneen lihapitoisen ruokavalion nauttimiseen (Stella ym. 2006, Xu ym. 2010, Rasmussen ym. 2012). Myös meidän tutkimuksessamme nämä kolme metaboliittia olivat kohonneet lihapitoisempaa raakaruokaa syövien koirien ryhmässä verrattuna kuivaruokaa syövien koirien ryhmään. Kreatiinia on paljon erityisesti punaisessa lihassa, mutta myös kanan ja kalan lihassa (Cross ym. 2011). Kreatiniini on puolestaan kreatiinin hajoamistuote, jota eritetään muun muassa virtsaan (teoksessa Brosnan ym. 2011). Trimetyyliamiinia taas muodostetaan koliinista suoliston mikrobiston toimesta, minkä jälkeen se

muunnetaan maksassa trimetyyliamiini-typpidioksidiksi (Romano ym. 2015). Koliinia on todettu olevan runsaasti muun muassa naudan ja kanan maksassa, kanamunissa, vehnän alkioissa, soijapavuiissa ja sianlihassa (Zeisel ym. 2003), joista ainakin naudan ja kanan maksaa, kanamunaa sekä sianlihaa löytyi raakaruokaa syövien koirien ruokavaliosta.

Raakaruokaa syövien koirien ryhmässä myös betaiinin pitoisuus oli kohonnut verrattuna kuivaruokaa syövien koirien ryhmään. Betaiinia voidaan joko johtaa koliinista tai saada ruoasta sellaisenaan (Ziesel ym. 2003). Korkeita betaiinipitoisuuksia on todettu muun muassa vehnässä, pinaatissa ja katkaravuiissa (Ziesel ym. 2003), joista ainakin pinaattia oli toisessa raakaruokavaihtoehdoista. Bertram ym. (2012) puolestaan havaitsivat rasvapitoisen ruoan nostavan maksan betaiinipitoisuutta, mikä saattaa olla yhteydessä raakaruoan korkeampaan rasvapitoisuuteen. Toisaalta myöskään kuivaruoka ei ollut varsinaisesti ”vähärasvaista”, joten suoria johtopäätöksiä on vaikea vetää.

Betaiini on lisäksi keskeisessä roolissa metioniinin metaboliassa (kuva 3), missä se osallistuu homokysteiinin metylisaatioon luovuttamalla reaktiossa metyyliiryhmän. Reaktion seurauksena betaiinista eli trimetyyliyglysiinistä tulee dimetyyliyglysiini. Myös glysiini voi toimia metyyliiryhmän luovuttajana metioniinin metaboliassa.

Homokysteiinin muuttaminen metioniiniksi vaatii kofaktorikseen B₁₂-vitamiinia. Homokysteiiniä muutetaan myös kystationiiniksi reaktiossa, joka puolestaan vaatii B₆-vitamiinia eli pyridoksiinia. Kystationiini muutetaan edelleen kystiiniksi. Myös B₉-vitamiini on keskeinen kofaktori metioniinin metaboliassa (teoksessa Brosnan ym. 2011).



Kuva 3. Metioniinin metabolia. Homokysteiinin metylisaatiossa betaiini tai glysiini voivat toimia metyyliryhmän luovuttajina, jolloin muodostuu metioniinia. Reaktiossa tarvitaan myös B₁₂-vitamiinia. Metioniini puolestaan muutetaan edelleen S-adenosyylimetioniiniksi, jota käytetään elimistössä eri reaktioissa metyyliryhmien luovuttajana. Homokysteiini voidaan muuttaa myös kystationiiniksi ja edelleen kysteiiniksi reaktioissa, joissa puolestaan tarvitaan B₆-vitamiinia (teoksessa Brosnan ym. 2011).

Tutkimuksissa on todettu B₆-vitamiinin puutteen nostavan erityisesti veren kystationiini- ja glysiinipitoisuuksia (Runyan & Gershoff 1969, Park & Linkswiler 1971, Lamers ym. 2009). Lisäksi jossain tutkimuksissa on havaittu myös proliinin, asparagiinihapon ja trimetyyliamiinityppioksidin kohonneita pitoisuuksia (Swendseid ym. 1964, Gregory ym. 2013) sekä kreatiinin, kreatiniinin ja dimetyyliglysiinin laskeneita pitoisuuksia (da Silva ym. 2013). Myös B₁₂-vitamiinin puutoksen on todettu nostavan muun muassa veren kystationiinipitoisuutta sekä B₉-vitamiinin puutoksen puolestaan veren kystationiinin, dimetyyliglysiinin sekä glysiinin pitoisuuksia (Allen ym. 1993a, Allen ym. 1993b, Stabler ym. 1996). Omassa tutkimuksessamme kuivaruokaa syöneiden koirien ryhmässä kystationiinin, glysiinin, proliinin ja asparagiinihapon pitoisuudet olivat kohonneet sekä kreatiinin ja kreatiniinin pitoisuudet

laskeneet raakaruokaa syövien koirien ryhmään verrattuna, mikä voisi viitata mahdolliseen B₆-vitamiinin puutokseen. Vastaavat muutokset sekä erityisesti dimetyylylglysiinin pitoisuuden nousu voisi viitata myös muiden metioniinin metaboliaan vaadittavien B-vitamiinien puutteeseen. Sen sijaan trimetyyliamiinityppioksidin pitoisuus oli kuivaruokaa syövien koirien ryhmässä laskenut, mutta tämä saattaa selittyä aikaisemminkin pohditun raakaruonan korkeammasta liha- ja sisäelinpitoisuudesta, minkä vuoksi sen määrä näkyisi ennen kaikkea kasvaneen raakaruokaa syövien koirien ryhmässä.

Edellä mainittujen B-ryhmän vitamiinien puutoksen on todettu laskevan homokysteiinin metylisaatiota metioniiniksi (Martinez ym. 2000), jolloin kyseisissä puutostiloissa veren metioniinin pitoisuuden on havaittu pysyneen normaalina tai laskeneen (Ueland & Schneede 2008). Omassa tutkimuksessamme kuivaruokaa syöneiden koirien ryhmässä veren metioniinin pitoisuus oli kuitenkin noussut verrattuna raakaruokaa syöneisiin, mikä ei puolestaan sopisi B-vitamiinien puutokseen. Toisaalta tutkimuksessamme käytettyyn kuivaruokaan oli myös lisätty metioniinia, mikä saattaa osaltaan selittää sen kohonneen pitoisuuden kuivaruokaa syöneiden koirien ryhmässä. On myös todettu, että silloin kun ravinnosta saadaan riittävästi metyyliiryhmien lähteitä, kuten koliinia tai betaiinia, homokysteiinin metylisaatio vähenee ja siitä muodostetaan sen sijaan enemmän kysteiinia (teoksessa Brosnan ym. 2011). Koska raakaruokaa syövien koirien ryhmässä veren betaiinipitoisuus oli kohonnut verrattuna kuivaruokaa syöneiden koirien ryhmään ja lisäksi voidaan olettaa, että liha- ja sisäelinpitoisemmasta raakaruosta saadaan hyvin muun muassa koliinia, voisi tämä olla myös yksi syy siihen, miksi metioniinin määrä raakaruokaa syöneiden koirien ryhmässä oli laskenut.

Raakaruokaa syövien ryhmässä laskenut 4-pyridoksiinihappo on B₆-vitamiinin eli pyridoksiinin lopputuote, jonka pitoisuuksia määrittämällä voidaan arvioida myös B₆-vitamiinin kokonaissaantia (Cabo ym. 2014). Siksi sen laskeneet pitoisuudet raakaruokaa syövien koirien ryhmässä voisivatkin viitata raakaruokaa syöneiden koirien mahdolliseen B₆-vitamiinin puutokseen, mikä puolestaan on ristiriidassa muiden B₆-vitamiinin puutosta ilmentävien metaboliittien kanssa, joita todettiin kuivaruokaa syöneiden koirien ryhmässä. Aikaisemmissa tutkimuksissa on kuitenkin todettu B₆-vitamiinin katabolian kiihtyvän erilaisissa tulehduksellisissa tiloissa, jolloin erityisesti pyridoksiinihapon ja B₆-vitamiinin aktiivisen muodon eli pyridoksaalifosfaatin

pitoisuuksien välinen suhde kasvaa (Ulvik ym. 2014). Tällöin voisi olla mahdollista, että kaikilla tutkimuksessa käytetyillä koirilla voisi atooppisen ihottuman takia olla B₆-vitamiinin katabolia kiihtynyt ja jo lähtötilanteessa pyridoksiinihapon pitoisuudet hieman koholla, mutta raakaruokaa syöneiden ryhmässä tämä katabolia olisi jostain syystä laskenut, jolloin myös pyridoksiinihapon pitoisuudet olisivat laskeneet verrattuna kuivaruokaa syöneiden ryhmään. Ihmisillä tehdyissä tutkimuksissa on myös todettu B₆-vitamiinin vaikuttavan myönteisesti atooppisen ihottuman hoidossa (Balabolkin ym. 1992), mikä voisi selittyä atopiaan mahdollisesti liittyvästä B₆-vitamiinin kiihtyneestä kulutuksesta ja sitä kautta aiheutuvasta jatkuvasta B₆-vitamiinin puutoksesta. Mikäli tätä tietoa voidaan soveltaa myös koiriin, voisi se tarjota yhden mahdollisen selityksen omassa tutkimuksessammekin havaittuun häiriintyneeseen B₆-vitamiinin metaboliaan.

Kreatiinin synteesi on yksi kehon eniten metyyliiryhmiä kuluttava reaktio. Eniten tähän käytetään metioniinin metaboliassakin muodostuvaa S-adenosyyylimetioniinia. Lisäksi sen muodostukseen käytetään glysiinia ja arginiinia. Arginiinia voidaan puolestaan muodostaa muun muassa sitrulliinista, ja sitrulliinia taas proliinista (teoksessa Brosnan ym. 2011). Raakaruokaa syöneiden koirien ryhmässä todettiin veren glysiini, sitrulliini, proliini ja metioniini pitoisuuksien laskeneen sekä kreatiini ja kreatiniini pitoisuuksien nousseen verrattuna kuivaruokaa syöneiden koirien ryhmään, mikä voisi viitata kiihtyneeseen kreatiinin synteesiin ja sitä kautta siihen käytettävien metaboliittien kulumiseen. Toisaalta raakaruokaa syöneiden koirien ryhmässä koirat saivat ravinnosta jo sellaisenaan enemmän kreatiinia, jolloin olisi hieman epäselvää, miksi kyseisessä ryhmässä kreatiinin synteesi olisi kiihtynyt verrattuna kuivaruokaa syöneisiin.

Asparagiinihappo ja sitrulliini osallistuvat molemmat ureakiertoon, missä ammoniakkaa muutetaan ureaksi (teoksessa Brosnan ym. 2011). Tällöin niiden laskeneet pitoisuudet raakaruokaa syövien ryhmässä voisivat selittyä lihapitoisen ruoan seurauksena kiihtyneestä ureasyklistä, jolloin myös siihen tarvittavien metaboliittien kulutuksen voisi olettaa kasvavan. Asparagiinihappo osallistuu myös monien muiden aminohappojen, kuten puriinien ja pyrimidiinien synteesiin (teoksessa Brosnan ym. 2011). Kuivaruokaa syöneiden koirien ryhmässä asparagiinihapon lisäksi koholla olivat myös sytosiini ja aminoisovoihappo, joista sytosiini on pyrimidiini ja aminoisovoihappo puolestaan erään pyrimidiinin, tymiinin, hajoamistuote (teoksessa Brosnan ym. 2011). Asparagiinihappoa taas muodostetaan sitrulliinista ja ornitiinista, ja sitrulliinia, kuten jo

aikaisemmin todettiin, proliinista (teoksessa Brosnan ym. 2011). Koska sitrulliinin, proliinin, asparagiinihapon, sytosiinin ja aminoisovoihapon pitoisuudet olivat kaikki joko kohonneet kuivaruokaa syöneiden ryhmässä tai laskeneet raakaruokaa syöneiden ryhmässä, saattavat nämä muutokset olla jossain yhteydessä toisiinsa. Myös riboosi-5-fosfaatti osallistuu pyriinien ja pyrimidiinien synteesiin (teoksessa Brosnan ym. 2011), mutta sen pitoisuus oli kuivaruokaa syöneiden koirien ryhmässä puolestaan laskenut. Yhtenä mahdollisuutena on, että kuivaruokaa syöneiden koirien ryhmässä pyrimidiinien ja puriinien synteesi on jostain syystä kiihtynyt, minkä vuoksi esimerkiksi sytosiinin ja aminoisovoihapon pitoisuudet olisivat nousseet, kun taas niiden synteesiin käytettävän riboosi-5-fosfaatin pitoisuus olisi laskenut lisääntyneen kulutuksen takia. Selvää selitystä muutoksille ei kuitenkaan vielä tämän tai aikaisempien tutkimusten tulosten perusteella saatu.

Kenodeoksikoolihappo on sappihappo, jota tuotetaan maksassa kolesterolista ja voidaan konjugoida glysiinin tai tauriinin avulla ennen erityistä ohutsuoleen (teoksessa Mañas ym. 2011). Ohutsuolessa puolestaan suoliston mikrobit hajottavat konjugoituneet sappihapot takaisin rasvaliukoisempaan muotoon, jolloin ne imeytyvät takaisin verenkiertoon (teoksessa Mañas ym. 2011). Voi siis olla, että kenodeoksikoolihapon laskenut pitoisuus raakaruokaa syövien koirien ryhmässä liittyy jollain tapaa glysiinin laskeneeseen pitoisuuteen, joskaan glysiiniä ei käytetä varsinaisesti kenodeoksikoolihapon valmistukseen vaan ainoastaan sen konjugoimiseen. Toisaalta tutkimuksemme ruokavalioiden erilainen vaikutus koirien suoliston pieneliöstöön voisi näkyä myös eroina sappihappojen pilkkomisessa ohutsuolessa ja näin ollen niiden uudelleenkäytettävyydessä. On myös todettu, että erityisesti rasva- ja proteiinipitoinen ruoka kiihdyttää sappihappojen erityistä, toisin kuin hiilihydraattipitoinen ruoka, jolla ei ole läheskään yhtä suurta vaikutusta sapen erityykseen (teoksessa Mañas ym. 2011). Tällöin voisi olettaa, että proteiini- ja rasvapitoisempaa raakaruokaa syöneiden koirien ryhmässä sappihappojen pitoisuudet olisivat päinvastoin kohonneet kuivaruokaa syöneiden koirien ryhmään verrattuna. Kaikki tutkimuksessamme otetut verinäytteet olivat paastonäytteitä, jolloin tietysti veren sappihappopitoisuudet pitäisi yleisesti ottaen olla suhteellisen matalat ja sappihappojen olla pääasiassa varastoituneena sappirakkoon (teoksessa Mañas ym. 2011). Sen perusteella voisi olettaa, että kuivaruokaa syöneiden ryhmässä konjugoituneiden sappihappojen pilkkoutuminen, takaisinimeytyminen tai

sappirakkoon kulkeutuminen olisi jostain syystä hidastunut, jolloin sappihappojen pitoisuudet seerumissa säilyisivät pidempään koholla.

Hypoksantiini on yksi puriinien johdannainen ja sitä on todettu olevan suuria määriä erityisesti sian ja naudan lihassa (Rong ym. 2015). Hypoksantiinin kohonnut pitoisuus raakaruokaa syövien koirien ryhmässä onkin todennäköisesti ollut seurausta sian ja naudan lihaa sisältäneen raakaruoan syömisestä, kun taas tutkimuksessa käytetyn kuivaruoan valmistukseen oli käytetty siipikarjan lihaa.

Sekä inositolin että α -aminoadipaatin on tutkimuksissa todettu liittyvän veren kohonneisiin glukoosipitoisuuksiin ja erityisesti α -aminoadipaattia pidetäänkin yhtenä diabetes mellituksen merkittävimpana indikaattorina (Wang ym. 2013). Tutkimuksissa on myös havaittu inositolin kohonneita pitoisuuksia diabetes mellitusta sairastavien ihmisten virtsassa (Hong ym. 2012). Inositolin on todettu vaikuttavan elimistössä insuliinin tavoin (Ortmeyer 1996, Yao ym. 2008) kun taas α -aminoadipaatin on todettu muun muassa lisäävän insuliinin eritystä haimasta (Wang ym. 2013). Molempien yhdisteiden onkin todettu laskevan veren korkeita glukoosipitoisuuksia (Ortmeyer 1996, Yao ym. 2008, Wang ym. 2013). Inositolin ja α -aminoadipaatin kohonneet pitoisuudet raakaruokaa syöneiden koirien ryhmässä saattaisivat siis viitata veren kohonneisiin glukoosipitoisuuksiin. Tutkimuksessa käytetyistä ruoista kuivaruuoassa oli enemmän kokonaisenergiaa 100 grammaa kohti, mutta mikäli huomioidaan energiapitoisuus kuiva-ainetta kohti, oli raakaruoka puolestaan energiapitoisempaa. Eräässä tutkimuksessa rasvapitoisella ruokavaliolla ruokituilla hiirillä oli todettu kohonneita α -aminoadipaattipitoisuuksia (Wang ym. 2013), mikä saattaisi olla yksi mahdollinen selitys α -aminoadipaatin ja mahdollisen veren glukoositason kohonneisiin pitoisuuksiin rasvapitoisempaa raakaruokaa syöneiden koirien ryhmässä. Tutkimuksissa on myös todettu diabeetikoilla laskeneita pitoisuuksia seerumin B₆- ja B₉-vitamiinitasoissa (Davis ym. 1976), jolloin esimerkiksi raakaruokaa syöneiden koirien ryhmässä laskeneella 4-pyridoksiinihapolla ja kohonneilla inositolin ja α -aminoadipaatin pitoisuuksilla voisi olla jonkinlainen yhteys.

Koska merkitseviä eroja löytyi niin monessa metioniinin metaboliaan liittyvässä metaboliitissa sekä B₆-vitamiinin metabolian lopputuotteessa, voidaan olettaa, että B₆-vitamiinin metabolia oli tutkimuskoirilla jollain tapaa häiriintynyt. Se, ovatko metabolian häiriöt seurausta jommastakummasta ruokavaliosta vai atopiasta, johon

toinen ruokavalioista olisi vaikuttanut positiivisesti, jää vielä epäselväksi. Omasta tutkimuksestamme on kuitenkin vielä myöhemmin tulossa tuloksia, joiden avulla pystytään vertailemaan, kuinka paljon ja mihin suuntaan kunkin metaboliitin pitoisuus on kummankin ryhmän sisällä muuttunut. Näin saadaan toivon mukaan vielä selvyyttä moniin toistaiseksi arvailuiden varaan jääneisiin pohdintoihin. Jatkotutkimuksia vaaditaan lisäksi muun muassa selvittämään, johtuvatko raaka- ja kuivaruoan erot ennen kaikkea eroista niiden ravintokoostumuksissa vai esimerkiksi erilaisista valmistustavoista ja sitä kautta ravinteiden erilaisesta hyväksikäytettävyydestä. Koska koirien seerumin normaaliarvoja ei metabolomiikan alalla vielä ole saatavilla, saadaan tutkimuksen tuloksista myös hyvä pohja näiden viitearvojen määrittämistä varten.

Atooppiseen ihottumaan liittyvissä aikaisemmin tehdyissä tutkimuksissa oli atooppisilla lapsilla todettu kohonneita pitoisuuksia muun muassa kreatiinissa, kreatiniinissa, dimetyyliyglysiinissä, kenodeoksikoolihapossa, asparagiinihapossa ja aminoisovoihapossa sekä laskeneita pitoisuuksia muun muassa betaiinissa ja glysiinissä (Assfalg ym. 2012, Huang ym. 2014). Näistä dimetyyliyglysiinin, kenodeoksikoolihapon, asparagiinihapon ja aminoisovoihapon pitoisuudet olivat omassa tutkimuksessa laskeneet raakaruokaa syövien koirien ryhmässä, kun taas betaiinin pitoisuus oli puolestaan noussut. Sen sijaan kreatiinin ja kreatiniinin pitoisuudet olivat raakaruokaa syöneiden ryhmässä kohonneet, kuten atooppisilla lapsillakin. Tulosten avulla voitaisiin tehdä varovaisia johtopäätöksiä, että raakaruoka saattaisi vaikuttaa moniin ihmisillä atopiaan liittyvien metaboliittien pitoisuuksiin juuri päinvastaisella tavalla, mutta aiheesta vaadittaisiin kuitenkin vielä jatkotutkimuksia merkitsevämpien johtopäätösten tekemiseksi. Metaboliittitasoja tulisi vertailla sairaiden ja terveiden koirien välillä, jotta voitaisiin tunnistaa mahdollisia atooppiseen ihottumaan koirilla linkittyviä metaboliitteja. Näitä tuloksia voitaisiin yhdessä ruokintatutkimusten tulosten kanssa mahdollisesti käyttää hyväksi arvioimaan ruokinnan vaikutusta atooppisen ihottuman ehkäisyssä ja hoidossa koirilla. Tuloksia voitaisiin myös yhdistää tietoon atopiaan liittyvistä kandidaattigeeneistä ja geenitoiminnan häiriöistä, parantamalla näin atooppisen ihottuman patogeneesin ymmärrystä. Näin voitaisiin tulevaisuudessa myös mahdollisesti pystyä suunnittelemaan atooppisen ihottuman ehkäisyyn jo tiineys- tai pentuaikana käytettäviä tai aikuisiällä atopian hoitoon soveltuvia ruokavalioita.

Vaikka tutkimuksessa käytetty aineisto oli melko pieni, pystyttiin tutkimuksen perusteella kuitenkin havaitsemaan selkeä ero seerumin metaboliittitasoissa eri ruokintaryhmien välillä ruokintakokeen loputtua. Tutkimuksessa käytettiin saman rotuisia koiria, joilla oli kaikilla eläinlääkärin toimesta diagnosoitu atooppinen ihottuma. Kaikilla tutkimuskoirilla noudatettiin myös samaa protokollaa tutkimuksen ajan. Näiden avulla pyrittiin minimoimaan geneettisten ja ympäristöperäisten tekijöiden vaikutus tuloksiin. Toisaalta koirat kuitenkin asuivat omistajiensa kanssa kotona eri puolilla Suomea, jolloin niiden elinympäristöt erosivat jossain määrin toisistaan. Alkutilanteessa havaittu metaboliittipitoisuuksien tasainen jakautuminen ryhmien välillä lisäsi kuitenkin tulosten merkitsevyyttä.

6 LÄHTEET

Allen R, Stabler S, Lindenbaum J. Serum betaine, N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. *Metabolism* 1993a, 42: 1448-1460.

Allen R, Stabler S, Savage D, Lindenbaum J. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) and folate deficiency. *FASEB J* 1993b, 7: 1344-1353.

Andersen M, Kristensen M, Manach C, Pujos-Guillot E, Poulsen S, Larsen T, Astrup A, Dragsted L. Discovery and validation of urinary exposure markers for different plant foods by untargeted metabolomics. *Anal Bioanal Chem* 2014a, 406: 1829-1844.

Andersen M, Rinnan Å, Manach C, Poulsen S, Pujos-Guillot E, Larsen T, Astrup A, Dragsted L. Untargeted metabolomics as a screening tool for estimating compliance to a dietary pattern. *J Proteome Res* 2014b, 13: 1405-1418.

Assfalg M, Bortoletti E, D'Onofrio M, Pigozzi R, Molinari H, Boner A, Peroni D, Piacentini G. An exploratory ¹H-nuclear magnetic resonance metabolomics study reveals altered urinespectral profiles in infants with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2012, 166: 1123-1125.

Astarita G, Langridge J. An emerging role for metabolomics in nutrition science. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2013, 6: 181-200.

Balabolkin I, Gordeeva G, Fuseva E, Dzhunelov A, Kalugina O, Khamidova M. Use of vitamins in allergic illnesses in children. *Vopr Med Khim* 1992, 38: 36-40.

Bartel J, Krumsiek J, Theis F. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. *Comput Struct Biotechnol J* 2013, 4: e201301009.

Bensignor E, Morgan D, Nuttall T. Efficacy of an essential fatty acid-enriched diet in managing canine atopic dermatitis: a randomized, single-blinded, cross-over study. *Vet Dermatol* 2008, 19: 156-162.

Bertram H, Larsen L, Chen X, Jeppesen P. Impact of high-fat and high-carbohydrate diets on liver metabolism studied in a rat model with a systems biology approach. *J Agric Food Chem* 2012, 60: 676-684.

Brennan L. Metabolomics in nutrition research: current status and perspectives. *Biochem Soc Trans* 2013, 41: 670-673.

Brosnan M, Brosnan J, Young V. Integration of metabolism 3: protein and amino acids. Teoksessa: Lanham-New S, Macdonald I, Roche H (toim.) *Nutrition and metabolism*. 2. p. Blackwell Publishing, Oxford 2011: 72-101.

Cabo R, Kozik K, Milanowski M, Hernes S, Slettan A, Haugen M, Ye S, Blomhoff R, Mansoor M. A simple high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the measurement of pyridoxal-5-phosphate and 4-pyridoxic acid in human plasma. *Clin Chim Acta* 2014, 433: 150-156.

Calvani R, Brasili E, Praticò G, Capuani G, Tomassini A, Marini F, Sciubba F, Finamore A, Roselli M, Marzetti E, Miccheli A. Fecal and urinary NMR-based metabolomics unveil an aging signature in mice. *Exp Gerontol* 2014, 49: 5-11.

Cappello T, Mauceri A, Corsaro C, Maisano M, Parrino V, Lo Paro G, Messina G, Fasulo S. Impact of environmental pollution on caged mussels *Mytilus galloprovincialis* using NMR-based metabolomics. *Mar Pollut Bull.* 2013, 77: 132-139.

Carlotti D, Costargent F. Analysis of positive skin tests in 449 dogs with allergic dermatitis. *Eur J Comp Anim Pra* 1994, 4: 42-59.

Chengappa M, Staats J, Oberst R, Gabbert N, McVey S. Prevalence of Salmonella in raw meat used in diets of racing greyhounds. *J Vet Diagn Inves* 1993, 5: 372-377.

Chorell E, Svensson M, Moritz T, Antti H. Physical fitness level is reflected by alterations in the human plasma metabolome. *Mol Biosyst* 2012, 8: 1187-1196.

Collino S, Martin F, Rezzi S. Clinical metabolomics paves the way towards future healthcare strategies. *Br J Clin Pharmacol* 2012, 75: 619-629.

Colyer A, Gilham M, Kamlage B, Rein D, Allaway D. Identification of intra- and inter-individual metabolite variation in plasma metabolite profiles of cats and dogs. *Br J Nutr* 2011, 106: 146-149.

Cork M, Danby S, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane M, Moustafa M, Guy R, Macgowan A, Tazi-Ahnini R, Ward S. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009, 129: 1892-1908.

- Cross A, Major J, Sinha R. Urinary biomarkers of meat consumption. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011, 20: 1107-1111.
- da Silva V, Rios-Avila L, Lamers Y, Ralat M, Midttun Ø, Quinlivan E, Garrett T, Coats B, Shankar M, Percival S, Chi Y, Muller K, Ueland P, Stacpoole P, Gregory J. Metabolite profile analysis reveals functional effects of 28-day vitamin B-6 restriction on one-carbon metabolism and tryptophan catabolic pathways in healthy men and women. *J Nutr* 2013, 143: 1719-1727.
- Dalgliesh C, Horning E, Horning M, Knox K, Yarger K. A gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts. *Biochem J* 1966, 101: 792-810.
- Davis R, Calder J, Curnow D. Serum pyridoxal and folate concentrations in diabetics. *Pathology* 1976, 8: 151-156.
- DeLay J, Laing J. Nutritional osteodystrophy in puppies fed a BARF diet. *AHL Newsletter* 2002, 6: 23.
- Dillitzer N, Becker N, Kienzle E. Intake of minerals, trace elements and vitamins in bone and raw food rations in adult dogs. *Br J Nutr* 2011, 106: 53-56.
- Duarte I, Ladeirinha A, Lamego I, Gil A, Carvalho L, Carreira I, Melo J. Potential markers of cisplatin treatment response unveiled by NMR metabolomics of human lung cells. *Mol Pharm* 2013, 10: 4242-4251.
- Fascetti A, Delaney J. Commercial and home-prepared diets. Teoksessa: Andrea J, Fascetti A, Delaney J (toim.) *Applied veterinary clinical nutrition*. Wiley-Blackwell, West Sussex 2012: 95-107.
- Fave G, Beckmann M, Draper J, Mathers J. Measurement of dietary exposure: a challenging problem which may be overcome thanks to metabolomics? *Genes Nutr* 2009, 4: 135-141.
- Favrot C, Steffan J, Seewald W, Picco F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol* 2010, 21: 23-30.
- Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, Schmidt V, Carter S, Hart C, McEwan N. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Vet Dermatol* 2009, 20: 179-84.
- Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002, 48: 155-171.
- Freeman L, Michel K. Evaluation of raw food diets for dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2001, 218: 705-709.

Gao Y, Lu Y, Huang S, Gao L, Liang X, Wu Y, Wang J, Huang Q, Tang L, Wang G, Yang F, Hu S, Chen Z, Wang P, Jiang Q, Huang R, Xu Y, Yang X, Ong C. Identifying early urinary metabolic changes with long-term environmental exposure to cadmium by mass-spectrometry-based metabolomics. *Environ Sci Technol* 2014, 48: 6409-6418.

German J, Watkins S, Fay L. Metabolomics in practice: emerging knowledge to guide future dietetic advice toward individualized health. *J Am Diet Assoc* 2005, 105: 1425-1432.

German J, Zivkovic A, Dallas D, Smilowitz J. Nutrigenomics and personalized diets: what will they mean for food? *Annu Rev Food Sci Technol* 2011, 2: 97-123.

Gibbons H, O'Gorman A, Brennan L. Metabolomics as a tool in nutritional research. *Curr Opin Lipidol* 2015, 26: 30-34.

Giovannucci E, Liu Y, Platz E, Stampfer M, Willett W. Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer* 2007, 121: 1571-1578.

Goodson S, Qiu Y, Sutton K, Xie G, Jia W, O'Brien D. Metabolic substrates exhibit differential effects on functional parameters of mouse sperm capacitation. *Biol Reprod* 2012, 87: 75.

Gregory J, Park Y, Lamers Y, Bandyopadhyay N, Chi Y, Lee K, Kim S, da Silva V, Hove N, Ranka S, Kahveci T, Muller K, Stevens R, Newgard C, Stacpoole P, Jones D. Metabolomic analysis reveals extended metabolic consequences of marginal vitamin B-6 deficiency in healthy human subjects. *PLoS One* 2013, 8: e63544.

Griffiths W, Koal T, Wang Y, Kohl M, Enot D, Deigner H. Targeted metabolomics for biomarker discovery. *Angew Chem Int Ed Engl* 2010, 49: 5426-5445.

Gross T, Ihrke P, Walder E, Affolter V. Perivascular diseases of the dermis; Atopic dermatitis. *Teoksessa: Skin diseases of the dog and cat; clinical and histopathologic diagnosis*. 2.p. Blackwell Publishing, Iowa 2005: 200-206.

Gutman L, Ottesen M, Quan T, Noce P, Katz S. An inter-familial outbreak of *Yersinia enterocolitica* enteritis. *N Engl J Med* 1973, 288: 1372-1377.

Halliwell R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet Immunol Immunopathol* 2006, 114: 207-208.

Heinzmann S, Brown I, Chan Q, Bictash M, Dumas M, Kochhar S, Stamler J, Holmes E, Elliott P, Nicholson J. Metabolic profiling strategy for discovery of nutritional biomarkers: proline betaine as a marker of citrus consumption. *Am J Clin Nutr* 2010, 92: 436-443.

Hellemann M, Marjeta P. *Koiran ruokinta*. Tallinna Raamatutrükikoda, Tallinna 2010.

- Hermo M, Saurina J, Barbosa J, Barrón D. High-resolution mass spectrometry applied to the study of metabolome modifications in various chicken tissues after amoxicillin administration. *Food Chem* 2014, 153: 405-413.
- Hill P, DeBoer D. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Vet Immunol Immunopathol* 2001, 81: 169-186.
- Hill's Science Plan™ Canine adult sensitive skin with chicken.
<http://www.hillspet.co.za/en-za/products/sp-canine-science-plan-adult-sensitive-skin-with-chicken-dry.html>, haettu 17.3.2015.
- Hong J, Jang H, Kang Y, Lee J, Kim K, Kim H, Park K, Ku B. Urinary chiro- and myo-inositol levels as a biological marker for type 2 diabetes mellitus. *Dis Markers* 2012, 33: 193-199.
- Huang C, Cheng M, Fan C, Hong C, Shiao M. Nicotinuric acid: a potential marker of metabolic syndrome through a metabolomics-based approach. *Diabetes Care* 2013, 36: 1729-1731.
- Huang Y, Chen G, Liu X, Shao Y, Gao P, Xin C, Cui Z, Zhao X, Xu G. Serum metabolomics study and eicosanoid analysis of childhood atopic dermatitis based on liquid chromatography-mass spectrometry. *J Proteome Res* 2014, 13: 5715-5723.
- Inman A, Olivry T, Dunston S, Monteiro-Riviere N, Gatto H. Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids in normal and atopic dogs. *Vet Pathol* 2001, 38: 720-723.
- Jackson H, Miller H, Halliwell R. Canine leucocyte histamine release: response to antigen and to anti-IgE. *Vet Immunol Immunopathol* 1996, 53: 195-206.
- Jansen J, Szymanska E, Hoefsloot H, Jacobs D, Strassburg K, Smilde A. Between metabolite relationships: an essential aspect of metabolic change. *Metabolomics* 2012a, 8: 422-432.
- Jansen J, Szymańska E, Hoefsloot H, Smilde A. Individual differences in metabolomics: individualised responses and between-metabolite relationships. *Metabolomics* 2012b, 8: 94-104.
- Joffe D, Schlesinger D. Preliminary assessment of the risk of Salmonella infection in dogs fed raw chicken diets. *Can Vet J* 2002, 43: 441-442.
- Johnson C, Gonzalez F. Challenges and opportunities of metabolomics. *J Cell Physiol* 2012, 227: 2975-2981.
- Johnson C, Patterson A, Idle J, Gonzalez F. Xenobiotic metabolomics: Major impact on the metabolome. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012, 52: 37-56.

- Jones D, Park Y, Ziegler T. Nutritional metabolomics: progress in addressing complexity in diet and health. *Annu Rev Nutr* 2012, 32: 183-202.
- Julia C, Vernay M, Salanave B, Deschamps V, Malon A, Oleko A, Hercberg S, Castetbon K. Nutrition patterns and metabolic syndrome: a need for action in young adults (French Nutrition and Health Survey—ENNS, 2006–2007). *Prev Med* 2010, 51: 488-493.
- Kawaguchi K, Braga III IS, Takahashi A, Ochiai K, Itakura C. Nutritional secondary hyperparathyroidism occurring in a strain of German shepherd puppies. *Jpn J Vet Res* 1993, 41: 89–96.
- Keun H, Beckonert O, Griffin J, Richter C, Moskau D, Lindon J, Nicholson J. Cryogenic probe ¹³C NMR spectroscopy of urine for metabonomic studies. *Anal Chem* 2002, 74: 4588-4593.
- Kind T, Scholz M, Fiehn O. How large is the metabolome? A critical analysis of data exchange practices in chemistry. *PLoS One* 2009, 4: e5440.
- Laflamme D, Abood S, Fascetti A, Fleeman L, Freeman L, Michel K, Bauer C, Kemp B, Doren J, Willoughby K. Pet feeding practices of dog and cat owners in the United States and Australia. *J Am Vet Med Assoc* 2008, 232: 687-694.
- Lamers Y, Williamson J, Ralat M, Quinlivan E, Gilbert L, Keeling C, Stevens R, Newgard C, Ueland P, Meyer K, Fredriksen A, Stacpoole P, Gregory J. Moderate dietary vitamin B-6 restriction raises plasma glycine and cystathionine concentrations while minimally affecting the rates of glycine turnover and glycine cleavage in healthy men and women. *J Nutr* 2009, 139: 452-460.
- Lampe J, Navarro S, Hullar M, Shojaie A. Inter-individual differences in response to dietary intervention: integrating omics platforms towards personalised dietary recommendations. *Proc Nutr Soc* 2013, 72: 207-218.
- LeMieux M, Al-Jawadi A, Wang S, Moustaid-Moussa N. Metabolic profiling in nutrition and metabolic disorders. *Adv Nutr* 2013, 4: 548-550.
- Liu E, McKeown N, Newby P, Meigs J, Vasan R, Quatromoni P, D'Agostino R, Jacques P. Cross-sectional association of dietary patterns with insulin-resistant phenotypes among adults without diabetes in the Framingham Offspring Study. *Br J Nutr* 2009, 102: 576-583.
- Llorach R, Garcia-Aloy M, Tulipani S, Vazquez-Fresno R, Andres-Lacueva C. Nutrimetabolomic strategies to develop new biomarkers of intake and health effects. *J Agric Food Chem* 2012, 60: 8797-8808.

- Locasale J, Melman T, Song S, Yang X, Swanson K, Cantley L, Wong E, Asara J. Metabolomics of human cerebrospinal fluid identifies signatures of malignant glioma. *Mol Cell Proteomics* 2012, 11: M111.014688.
- Lund E, Armstrong J, Kirk C, Kolar L, Klausner J. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 1999, 214: 1336-1341.
- Manach C, Hubert J, Llorach R, Scalbert A. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Mol Nutr Food Res* 2009, 53: 1303-1315.
- Mañas M, Martínez de Victoria E, Gil A, Yago M, Mathers J. The gastrointestinal tract. Teoksessa: Lanham-New S, Macdonald I, Roche H (toim.) *Nutrition and metabolism*. 2. p. Blackwell Publishing, Oxford 2011: 205-246.
- Marcobal A, Kashyap P, Nelson T, Aronov P, Donia M, Spormann A, Fischbach M, Sonnenburg J. A metabolomic view of how the human gut microbiota impacts the host metabolome using humanized and gnotobiotic mice. *ISME J* 2013, 7: 1933-1943.
- Marsella R, Girolomoni G. Canine models of atopic dermatitis: a useful tool with untapped otential. *J Invest Dermatol* 2009, 129: 2351-2357.
- Marsella R, Nicklin C, Lopez J. Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Vet Dermatol* 2006, 17: 306-312.
- Marsella R, Sousa C, Gonzales A, Fadok V. Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *J Am Vet Med Assoc* 2012, 241: 194-207.
- Martinez M, Cuskelly G, Williamson J, Toth J, Gregory J. Vitamin B-6 deficiency in rats reduces hepatic serine hydroxymethyltransferase and cystathionine beta-synthase activities and rates of in vivo protein turnover, homocysteine remethylation and transsulfuration. *J Nutr* 2000, 130: 1115-1123.
- Mcewan N. Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine keratinocytes in atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 2000, 68: 279-283.
- Mellert W, Kapp M, Strauss V, Wiemer J, Kamp H, Walk T, Looser R, Prokoudine A, Fabian E, Krennrich G, Herold M, van Ravenzwaay B. Nutritional impact on the plasma metabolome of rats. *Toxicol Lett* 2011, 207: 173-181.
- Merryman-Simpson A, Wood S, Fretwell N, Jones P, McLaren W, McEwan N, Clements D, Carter S, Ollier W, Nuttall T. Gene (mRNA) expression in canine atopic dermatitis: microarray analysis. *Vet Dermatol* 2008, 19: 59-66.

Mosmann T, Cherwinski H, Bond M, Giedlin M, Coffman R. Two types of murine helper T cell clone I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins. *J Immunol* 1986, 136: 2348-2357.

MUSH B.A.R.F Vaisto© Kalkkuna-kanan-lammas –ateria 3 kg.
<http://www.mushbarf.com/fi/koiranruokamme/mush-barf-vaisto/mush-barf-vaisto-kalkkuna-kana-lammas-ateria-3kg>, haettu 17.3.2015a.

MUSH B.A.R.F Vaisto© Nauta-kalkkuna-lohi –ateria 3 kg.
<http://www.mushbarf.com/fi/koiranruokamme/mush-barf-vaisto/mush-barf-vaisto-nauta-kalkkuna-lohi-ateria-3kg>, haettu 17.3.2015b.

Nettleton J, Schulze M, Jiang R, Jenny N, Burke G, Jacobs D. A priori–defined dietary patterns and markers of cardiovascular disease risk in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Clin Nutr* 2008, 88: 185-194.

Nicholson J, Lindon J. Systems biology: metabonomics. *Nature* 2008, 455: 1054–1056.

Noto A, Cibecchini F, Fanos V, Mussap M. NGAL and metabolomics: the single biomarker to reveal the metabolome alterations in kidney injury. *Biomed Res Int* 2013, 2013: 612032.

Nuttall T, Knight P, McAleese S, Lamb J, Hill P. Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2002a, 32: 789-795.

Nuttall T, Knight P, McAleese S, Lamb J, Hill P. T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2002b, 87: 379-384.

Nuttall T, Uri M, Halliwell R. Canine atopic dermatitis – what have we learned? *Vet Rec* 2013, 172: 201-207.

O'Gorman A, Brennan L. Metabolomic applications in nutritional research: a perspective. *J Sci Food Agric* 2015.

Olivry T, Dean G, Tompkins M, Dow J, Moore P. Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Exp Dermatol* 1999, 8: 204-211.

Olivry T, DeBoer D, Favrot C, Jackson H, Mueller R, Nuttall T, Prélaud P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol* 2010, 21: 233-248.

Olivry T, Marsella R, Maeda S, Pucheu-Haston C, Hammerberg B. Mechanism of lesion formation in canine atopic dermatitis: 2004 hypothesis. Teoksessa: Hillier A, Foster A, Kwochka K (toim.) *Advances in Veterinary Dermatology* volume 5. Blackwell Publising, Oxford 2005: 11-16.

- Orešič M, Pietiläinen K, Hänninen V. Metabolomiikka – lääketieteellisen tutkimuksen uusi työkalu. *Duodecim* 2007, 123: 2991–2997.
- Ortmeyer H. Dietary myoinositol results in lower urine glucose and in lower postprandial plasma glucose in obese insulin resistant rhesus monkeys. *Obes Res* 1996, 4: 569-575.
- O'Sullivan A, Gibney M, Brennan L. Dietary intake patterns are reflected in metabolomic profiles: potential role in dietary assessment studies. *Am J Clin Nutr* 2011, 93: 314-321.
- Overmyer K, Thonusin C, Qi N, Burant C, Evans C. Impact of anesthesia and euthanasia on metabolomics of mammalian tissues: studies in a C57BL/6J mouse model. *PLoS One* 2015, 10: e0117232.
- Park Y, Linkswiler H. Effect of vitamin B6 depletion in adult man on the plasma concentration and the urinary excretion of free amino acids. *J Nutr* 1971, 101: 185-191.
- Picco F, Zini E, Nett C, Naegeli C, Bigler B, Rüfenacht S, Roosje P, Gutzwiller ME, Wilhelm S, Pfister J, Meng E, Favrot C. A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Vet Dermatol* 2008, 19:150-155.
- Pieper R, Neumann K, Kröger S, Richter J, Wang J, Martin L, Bindelle J, Htoo J, Vahjen V, Van Kessel A, Zentek J. Influence of fermentable carbohydrates or protein on large intestinal and urinary metabolomic profiles in piglets. *J Anim Sci* 2012, 90: 34-36.
- Plager D, Torres S, Koch S, Kita H. Gene transcription abnormalities in canine atopic dermatitis and related human eosinophilic allergic diseases. *Vet Immunol Immunopathol* 2012, 149: 136-142.
- Plevnik Kapun A, Salobir J, Levart A, Tavčar Kalcher G, Nemec Svete A, Kotnik T. Vitamin E supplementation in canine atopic dermatitis: improvement of clinical signs and effects on oxidative stress markers. *Vet Rec* 2014, 175: 560.
- Prélaud P, Power HT. Atopic dermatitis syndrome. Teoksessa: Guaguére É, Prélaud P (toim.) *A Practical Guide to Canine Dermatology*. Kallianxis, Italia 2008: 229-252.
- Raditic D, Remillard R, Tater K. ELISA testing for common food antigens in four dry dog foods used in dietary elimination trials. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2011, 95: 90-97.
- Rasmussen L, Winning H, Savorani F, Toft H, Larsen T, Dragsted L, Astrup A, Engelsen S. Assessment of the Effect of High or Low Protein Diet on the Human Urine Metabolome as Measured by NMR. *Nutrients* 2012, 4: 112-131.

- Reiter L, Torres S, Wertz P. Characterization and quantification of ceramides in the nonlesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared with controls. *Vet Dermatol* 2009, 20: 260-266.
- Romano K, Vivas E, Amador-Noguez D, Rey F. Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide. *MBio* 2015, 6.
- Rong S, Zou L, Zhang Y, Zhang G, Li X, Li M, Yang F, Li C, He Y, Guan H, Guo Y, Wang D, Cui X, Ye H, Liu F, Pan H, Yang Y. Determination of purine contents in different parts of pork and beef by high performance liquid chromatography. *Food Chem* 2015, 170: 303-307.
- Rubio-Aliaga I, Kochhar S, Silva-Zolezzi I. Biomarkers of nutrient bioactivity and efficacy: a route toward personalized nutrition. *J Clin Gastroenterol* 2012, 46: 545-554.
- Runyan T, Gershoff S. Glycine metabolism in vitamin B6-deficient and deoxypyridoxine-treated rats. *J Nutr* 1969, 98: 113-118.
- Sato Y, Mori T, Koyama T, Nagase H. Salmonella Virchow infection in an infant transmitted by household dogs. *J Vet Med Sci* 2000, 62: 767-769.
- Scalbert A, Brennan L, Fiehn O, Hankemeier T, Kristal B, van Ommen B, Pujos-Guillot E, Verheij E, Wishart D, Wopereis S. Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics* 2009, 5: 435-458.
- Scalbert A, Brennan L, Manach C, Andres-Lacueva C, Dragsted L, Draper J, Rappaport S, van der Hooft J, Wishart D. The food metabolome: a window over dietary exposure. *Am J Clin Nutr* 2014, 99: 1286-1308.
- Schlesinger D, Joffe D. Raw food diets in companion animals: A critical review. Raw food diets in companion animals: A critical review. *Can Vet J* 2011, 52: 50-54.
- Scott D, Miller W, Griffin C. Skin immune system and allergic skin diseases; Canine atopic disease. Teoksessa Muller & Kirk's Small animal dermatology. 6. p. W.B. Saunders company, Philadelphia 2001: 574-601.
- Scott D, Paradis M. A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: Small Animal Clinic, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec. *Can Vet J* 1990, 31: 830-835.
- Serkova N, Standiford T, Stringer K. The emerging field of quantitative blood metabolomics for biomarker discovery in critical illnesses. *Am J Respir Crit Care Med* 2011, 184: 647-655.

- Shimada K, Yoon J, Yoshihara T, Iwasaki T, Nishifuji K. Increased transepidermal water loss and decreased ceramides content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2009, 20: 541-546.
- Stabler S, Lindenbaum J, Allen R. The use of homocysteine and other metabolites in the specific diagnosis of vitamin B-12 deficiency. *J Nutr* 1996, 126: 1266-1272.
- Stella C, Beckwith-Hall B, Cloarec O, Holmes E, Lindon J, Powell J, van der Ouderaa F, Bingham S, Cross A, Nicholson J. Susceptibility of human metabolic phenotypes to dietary modulation. *J Proteome Res* 2006, 5: 2780-2788.
- Stogdale L, Diehl G. In support of bones and raw food diets. *Can Vet J* 2003, 44: 783.
- Strohmeyer R, Morley P, Hyatt D, Dargatz D, Scorza A, Lappin M. Evaluation of bacterial and protozoal contamination of commercially available raw meat diets for dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2006, 228: 537-542.
- Swendseid M, Villalobos J, Friedrich B. Free amino acids in plasma and tissues of rats fed a vitamin B6-deficient diet. *J Nutr* 1964, 82: 206-208.
- Thompson A. Ingredients: Where pet food starts. *Top Companion Anim Med* 2008, 23: 127-132.
- Tian H, Bai J, An Z, Chen Y, Zhang R, He J, Bi X, Song Y, Abliz Z. Plasma metabolome analysis by integrated ionization rapid-resolution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2013, 27: 2071-2080.
- Trushina E, Dutta T, Persson X, Mielke M, Petersen R. Identification of altered metabolic pathways in plasma and CSF in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using metabolomics. *PLoS One* 2013, 8: e63644.
- Tsuruoka M, Hara J, Hirayama A, Sugimoto M, Soga T, Shankle W, Tomita M. Capillary electrophoresis-mass spectrometry-based metabolome analysis of serum and saliva from neurodegenerative dementia patients. *Electrophoresis* 2013, 34: 2865-2872.
- Tweeddale H, Notley-McRobb L, Ferenci T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis. *J Bacteriol* 1998, 180:5109-5116.
- Ueland P, Schneede J. Measurement of methylmalonic acid, homocysteine and methionine in cobalamin and folate deficiencies and homocysteinuria. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2008, 128: 690-693.
- Ulvik A, Midttun Ø, Pedersen E, Eussen S, Nygård O, Ueland P. Evidence for increased catabolism of vitamin B-6 during systemic inflammation. *Am J Clin Nutr* 2014, 100: 250-255.

- Vester B, Liu K, Keel T, Graves T, Swanson K. In utero and postnatal exposure to a high-protein or high-carbohydrate diet leads to differences in adipose tissue mRNA expression and blood metabolites in kittens. *Br J Nutr* 2009, 102: 1136-1144.
- Vian M, Ludwig C, Rhodes S, Günther U, Allaway D. Validation of a urine metabolome fingerprint in dog for phenotypic classification. *Metabolomics* 2007, 3: 453-463.
- Villas-Boas S, Koulman A, Lane G. Analytical methods from the perspective of method standardization. *Topics in Current Genetics* 2007, 18: 11-52.
- Wagner K, Tomasch R, Elmadfa I. Impact of diets containing corn oil or olive/sunflower oil mixture on the human plasma and lipoprotein lipid metabolism. *Eur J Nutr* 2001, 40: 161-167.
- Wang T, Ngo D, Psychogios N, Dejam A, Larson M, Vasan R, Ghorbani A, O'Sullivan J, Cheng S, Rhee E, Sinha S, McCabe E, Fox C, O'Donnell C, Ho J, Florez J, Magnusson M, Pierce K, Souza A, Yu Y, Carter C, Light P, Melander O, Clish C, Gerszten R. 2-Aminoadipic acid is a biomarker for diabetes risk. *J Clin Invest* 2013, 123: 4309-4317.
- Weese J, Rousseau J, Arroyo L. Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. *Can Vet J* 2005, 46: 513-516.
- Westerhuis J, Hoefsloot H, Smit S, Vis D, Smilde A, van Velzen E, van Duijnhoven J, Dorsten F. Assessment of PLSDA cross validation. *Metabolomics* 2008, 4: 81-89.
- Wishart D. Advances in metabolite identification. *Bioanalysis* 2011, 3: 1769-1782.
- Wood S, Clements D, Ollier W, Nuttall T, McEwan N, Carter S. Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores. *J Dermatol Sci* 2009, 55: 27-33.
- Xu F, Tavintharan S, Sum C, Woon K, Lim S, Ong C. Metabolic signature shift in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry-based metabolomics. *J Clin Endocrinol Metab* 2013, 98: e1060-5.
- Xu J, Yang S, Cai S, Dong J, Li X, Chen Z. Identification of biochemical changes in lactovegetarian urine using ¹H NMR spectroscopy and pattern recognition. *Anal Bioanal Chem* 2010, 396: 1451-1463.
- Yang H, Choi M, Wen H, Kwon H, Jung K, Hong S, Kim J, Hong S, Park S. An effective assessment of simvastatin-induced toxicity with NMR-based metabonomics approach. *PLoS One* 2011, 6: e16641.
- Yao Y, Shan F, Bian J, Chen F, Wang M, Ren G. D-chiro-inositol-enriched tartary buckwheat bran extract lowers the blood glucose level in KK-Ay mice. *J Agric Food Chem* 2008, 56: 10027-10031.

Yau Y, Leong R, Shin S, Bustamante S, Pickford R, Hejazi L, Campbell B, Wasinger V. Bimodal plasma metabolomics strategy identifies novel inflammatory metabolites in inflammatory bowel diseases. *Discov Med* 2014, 18: 113-124.

Yoon J, Nishifuji K, Sasaki A, Ide K, Ishikawa J, Yoshihara T, Iwasaki T. Alteration of stratum corneum ceramide profiles in spontaneous canine model of atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2011, 20: 732-736.

Yu B, Zheng Y, Alexander D, Morrison A, Coresh J, Boerwinkle E. Genetic determinants influencing human serum metabolome among African Americans. *PLoS Genet* 2014, 10: e1004212.

Zeisel S, Mei-Heng M, Howe J, Holden J. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J Nutr* 2003, 133: 1302-1307.

Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J Proteomics* 2012a, 75: 1079-1088.

Zhang A, Sun H, Wang X. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: a systematic review. *Anal Bioanal Chem* 2012b, 404: 1239-1245.

Zhang G-F, Sadhukhan S, Tochtrop G, Brunengraber H. Metabolomics, pathway regulation, and pathway discovery. *J Biol Chem* 2011, 286: 23631-23635.

Zhang X, Xu L, Shen J, Cao B, Cheng T, Zhao T, Liu X, Zhang H. Metabolic signatures of esophageal cancer: NMR-based metabolomics and UHPLC-based focused metabolomics of blood serum. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1832:1207-1216.

Zur G, Ihrke P, White S, Kass P. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992–1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Vet Dermatol* 2002, 13: 89–102.